

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

11 May 1998 (11.05.98)

International application No.

PCT/EP96/05126

International filing date (day/month/year)

21 November 1996 (21.11.96)

Applicant

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

\_\_\_\_\_ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Mafla

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

11 July 1997 (11.07.97)

International application No.

PCT/EP96/05126

Applicant's or agent's file reference

14/032

International filing date (day/month/year)

21 November 1996 (21.11.96)

Priority date (day/month/year)

23 November 1995 (23.11.95)

Applicant

SCHMIDT, Walter et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 June 1997 (17.06.97)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Peggy Steunenberg

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>14/032</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 96/05126</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>21/11/1996</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/11/1995</b>
Anmelder  <b>BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:  
 Abb. Nr.                      ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☒ keine der Abb.  
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.  
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N5/08 A61K35/14 A61K35/26 A61K39/12 A61K38/19  
C07K14/725

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 93 (18). 1996. 9759-9763. ISSN: 0027-8424, XP002025886</p> <p>SCHMIDT W ET AL: "Transloading of tumor cells with foreign major histocompatibility complex class I peptide ligand: A novel general strategy for the generation of potent cancer vaccines." siehe Seite 9761, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, letzter Absatz</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-23



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19. 03. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Halle, F





## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	EUR. J. CANCER, PART A (1996), 32A(8), 1408-1412 CODEN: EJCTEA, 1996, XP002025887 ZIER, K. S. ET AL: "Tumor cell vaccines that secrete interleukin-2 (IL-2) and interferon.gamma. (IFN.gamma.) are recognized by T cells while resisting destruction by natural killer (NK) cells" siehe Seite 1409, linke Spalte, Absatz 3 ---	1-23
Y	CELLULAR IMMUNOLOGY 155 (1). 1994. 123-133. ISSN: 0008-8749, XP000650528 BASKAR S ET AL: "MHC class II-transfected tumor cells induce long-term tumor -specific immunity in autologous mice." siehe Seite 129, Absatz 2 siehe Seite 130, Absatz 2 ---	1-23
Y	EP 0 569 678 A (YEDA RES & DEV) 18.November 1993 siehe Ansprüche 1-18 ---	1-23
A	WO 94 23031 A (LUDWIG INST CANCER RES) 13.Oktober 1994 cited in the application -----	



**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP96/05126	International filing date (day/month/year) 21 November 1996 (21.11.1996)	Priority date (day/month/year) 23 November 1995 (23.11.1995)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/08, A61K 35/14, 35/26, 39/12, 38/19, C07K 14/725		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 June 1997 (17.06.1997)	Date of completion of this report 01 April 1998 (01.04.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP96/05126

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-39, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-35, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/9-9/9, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 96/05126

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	3-35	YES
	Claims	1, 2	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

1. The following search report citation is considered in this report:  
EP-A-0 569 678 (cited in the description).
2. This report assumes that all the claims have the priority of the filing date of the priority document. If so, the documents described as P and Y documents in the international search report are not part of the prior art.
3. The present invention is part of the field of development of therapeutic vaccines. It essentially involves a tumour vaccine which contains tumour cells (TZ). The TZ are charged with peptides, derived from tumour antigens which only partially have determinants of the MHC-I-haplotype and can be identified as foreign by the patient's immune system. A cellular immune response is thus triggered in the patient.

#### Novelty

4. The subject matter of claims 1-35 is regarded as





novel since charging the tumour cells with peptides as ligands for the MHC-I-haplotype, as defined in the claims, is not disclosed in the prior art.

#### Inventive step

5. The subject matter of claims 1 and 2 does not appear to involve an inventive step.

The description states that the immune system should distinguish the tumour cells (TZ) from "normal" cells by the peptide neo-epitopes expressed on the TZ. However the immunogenicity of the TZ remains low. Although the neo-epitopes are sufficiently expressed, the immunological response to these epitopes is insufficient. An attempt is being made to produce vaccines with alienated TZ with a surface on which new antigens are expressed. The immune system thus reacts to the foreign peptides of the alienated TZ and consequently also to and against the natural tumour antigens of the TZ. The tumour vaccines of the invention are characterised by these alienated TZ. A part of the peptides expressed by the alienated TZ is identical to the patient's peptides (i.e. a cell surface MHC-I-haplotype of the patient) and one part is foreign. The TZ used and treated can be autologous (from the patient to be vaccinated) or allogenic (not from the patient).

D1, considered to be the closest prior art, discloses (see D1, *inter alia*, page 3, lines 16-34) tumour vaccines from which the subject matter of claims 1 and 2 differs in that a part of the



expressed peptides comes from the MHC-I-haplotype of the patient. The object to be attained, with reference to claims 1 and 2, is therefore to provide a more specific tumour vaccine which involves use of more specific MHC-haplotype peptides responsible for controlling the transplantation antigens (class I). However, when this haplotype is used it is one of a plurality of possible MHC-haplotypes, e.g. from class I or II, which a person skilled in the art would select without inventive activity to prepare the tumour vaccine. Since cytotoxic T-cell activity is desired, a person skilled in the art will prefer the MHC-haplotype of class I. The subject matter of claims 1 and 2 therefore appears to be obvious.

6. The subject matter of claims 3-35 in which the dependent claims at least refer to claim 3, appears to involve an inventive step. The tumour vaccine as per claim 3 is characterised in that it contains allogenic tumour cells (TZ). In view of the prior art, this tumour vaccine is not obvious and is characterised by allogenic TZ in conjunction with alienated peptides in the MHC-context, as defined in the claims.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/05126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0569678	18-11-93	CA-A- 2092674	14-09-93
WO-A-9423031	13-10-94	AU-B- 668772	16-05-96
		AU-A- 5096993	29-03-94
		AU-A- 6447594	24-10-94
		CA-A- 2143335	17-03-94
		CA-A- 2159098	13-10-94
		CN-A- 1093751	19-10-94
		EP-A- 0658113	21-06-95
		EP-A- 0690915	10-01-96
		FI-A- 950887	27-02-95
		FI-A- 954536	25-09-95
		JP-T- 8500837	30-01-96
		JP-T- 8508402	10-09-96
		NO-A- 950660	24-02-95
		NO-A- 953699	20-11-95
		NZ-A- 263693	26-07-96
		US-A- 5462871	31-10-95
		WO-A- 9405304	17-03-94
		US-A- 5541104	30-07-96
		ZA-A- 9401644	12-10-94



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

REC'D 08 APR 1998

PCT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14/032 PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP96/05126	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/11/1996	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 23/11/1995
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N5/08		
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt    Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I    ☒ Grundlage des Berichts
- II    ☐ Priorität
- III    ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV    ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V    ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI    ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII    ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII    ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  17/06/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  01.04.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Halle, F  Telefon (+49-89) 2399-8537  





**I. Grundlag des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-39                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-35                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/9-9/9                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-35
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	3-35
	Nein: Ansprüche	1,2
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-35
	Nein: Ansprüche	



**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**



**Zu Punkt V**

1. Das folgende im Recherchenbericht zitierte Dokument wird in diesem Bericht angegeben:

D1: EP-A-0 569 678 (in der Beschreibung angeführt)

2. Diesem Bericht liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche die Priorität des Anmeldetags des Prioritätsdokuments genießen: in diesem Falle gehören die Dokumente, bezeichnet im internationalen Recherchenbericht als P,Y-Dokumente, nicht zum Stand der Technik.
3. Die vorliegende Erfindung gehört zum Gebiet der Entwicklung therapeutischer Vakzinen. Sie beruht im wesentlichen auf einer Tumorstoffvakzine die Tumorzellen (TZ) enthält. Die TZ werden beladen mit Peptiden, abgeleitet von Tumorstoffantigenen, die nur teilweise Determinante des MHC-I-Haplotyps aufweisen und als fremd anerkannt werden vom Immunsystem des Patienten. Somit wird beim Patienten eine zelluläre Immunantwort ausgelöst.

**Neuheit**

4. Der Gegenstand der Ansprüche 1-35 gilt als neu, da das Beladen der Tumorzellen mit Peptiden als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, wie sie in den Ansprüchen definiert sind, nicht im Stand der Technik offenbart ist.

**Erfinderische Tätigkeit**

5. Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 scheint nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

Laut Beschreibung sollte das Immunsystem die Tumorzellen (TZ) von "normalen" Zellen durch die auf den TZ exprimierten Peptid-Neoepitopen, unterscheiden. Jedoch bleibt die Immunogenizität der TZ gering. Die Neoepitopen sind zwar genügend exprimiert, jedoch ist die immunologische Antwort auf diese Epitopen unzureichend. Daher wird versucht Vakzine mit verfremdeten TZ herzustellen,



auf deren Oberfläche neue Antigene exprimiert werden. Somit reagiert das Immunsystem auf die fremden Peptide der verfremdeten TZ und folglich auch auf und gegen die eigenen Tumorantigene der TZ. Die Tumorstoffe gemäß der Erfindung sind gekennzeichnet durch solche verfremdete TZ. Von den verfremdeten TZ exprimierten Peptiden ist ein Teil gleich mit den Peptiden des Patienten (also eine Zelloberfläche MHC-I-Haplotyp des Patienten) und ein Teil ist fremd. Die verwendeten und behandelten TZ können autologe (vom zu vakzinierenden Patienten selbst) oder allogene (Patienten-fremd) Zellen sein.

Dokument D1, das als relevanter Stand der Technik angesehen wird, offenbart (s. D1, unter anderem, Seite 3, Zeilen 16-34) Tumorstoffe, von denen sich der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 dadurch unterscheidet, daß ein Teil der exprimierten Peptiden vom MHC-I-Haplotyp des Patienten stammen. Die zu lösende Aufgabe, im Bezug auf die Ansprüche 1 und 2, kann somit darin gesehen werden, eine spezifischere Tumorstoffe bereit zu stellen, die auf den Einsatz spezifischerer MHC-Haplotyp Peptiden, verantwortlich für die Kontrolle der Transplantationsantigene (Klasse I), beruht. Jedoch, beim Einsatz von diesem Haplotyp handelt es sich um einen von mehreren möglichen MHC-Haplotypen, z.B. von der Klasse I oder II, die der Fachmann ohne erfinderisches Zutun auswählen würde, um das Tumorstoff bereit zu stellen. Da eine cytotoxische T-Zellen Aktivität erwünscht ist, wird der Fachmann den MHC-Haplotyp der Klasse I bevorzugen. Daher scheint der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 naheliegend zu sein.

6. Der Gegenstand der Ansprüche 3-35, wobei die abhängigen Ansprüche sich wenigstens auf Anspruch 3 beziehen, scheint auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen. Die Tumorstoffe nach Anspruch 3 ist dadurch gekennzeichnet, daß sie allogene Tumorzellen (TZ) enthält. Im Hinblick auf den Stand der Technik ist eine solche Tumorstoffe, gekennzeichnet durch allogene TZ in Verbindung mit verfremdeten Peptiden im MHC-Kontext, wie in den Ansprüchen definiert, nicht naheliegend.





# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/EP96/05126

International Application No.

21 NOV 1996 (21.11.96)

International Filing Date

EUROPEAN PATENT OFFICE  
PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) 14/032

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
Tumour vaccine and process for preparing it	
<b>Box No. II APPLICANT</b>	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	<input type="checkbox"/> This person is also inventor.
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH Postfach 200 D-55216 Ingelheim am Rhein DE	Telephone No. 06132/772282
	Facsimile No. 06132/774377
	Teleprinter No. 4187910 bi d
State (i.e. country) of nationality: DE	State (i.e. country) of residence: DE
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	This person is:
SCHMIDT, Walter Steingasse 2a/16 A-1030 Vienna AT	<input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State (i.e. country) of nationality: DE	State (i.e. country) of residence: AT
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input type="checkbox"/> agent <input checked="" type="checkbox"/> common representative	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	Telephone No.
Boehringer Ingelheim International GmbH Postfach 200 D-55216 Ingelheim am Rhein DE	06132/772282
	Facsimile No.
	06132/774377
	Teleprinter No.
	4187910 bi d
<input type="checkbox"/> Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	



## Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BIRNSTIEL, Max  
Skodagasse 14-16/15  
A-1080 Vienna  
AT

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

CH

State (i.e. country) of residence:

AT

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SCHWEIGHOFFER, Tamás  
Colloredogasse 2/4  
A-1180 Vienna  
AT

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

HU

State (i.e. country) of residence:

AT

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

STEINLEIN, Peter  
Rembrandtstrasse 10/4  
A-1020 Vienna  
AT

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

DE

State (i.e. country) of residence:

AT

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BUSCHLE, Michael  
Hyrtlstrasse 35/11  
A-2345 Brunn/Gebirge  
AT

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

DE

State (i.e. country) of residence:

AT

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.



**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☐ **AP ARIPO Patent:** KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line) . . . . .

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia . . . . .                         |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia . . . . .                               | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova . . . . .                       |
| <input type="checkbox"/> AT Austria . . . . .                               | <input type="checkbox"/> MG Madagascar . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia . . . . .                  | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia . . . . . |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan . . . . .                            | <input type="checkbox"/> MN Mongolia . . . . .                                  |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados . . . . .                              | <input type="checkbox"/> MW Malawi . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria . . . . .                   | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico . . . . .                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil . . . . .                     | <input type="checkbox"/> NO Norway . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus . . . . .                    | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand . . . . .                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada . . . . .                     | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland . . . . .                         |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein . . . . .  | <input type="checkbox"/> PT Portugal . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China . . . . .                      | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania . . . . .                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic . . . . .             | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation . . . . .             |
| <input type="checkbox"/> DE Germany . . . . .                               | <input type="checkbox"/> SD Sudan . . . . .                                     |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark . . . . .                               | <input type="checkbox"/> SE Sweden . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia . . . . .                    | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore . . . . .                      |
| <input type="checkbox"/> ES Spain . . . . .                                 | <input type="checkbox"/> SI Slovenia . . . . .                                  |
| <input type="checkbox"/> FI Finland . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia . . . . .                       |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom . . . . .                        | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan . . . . .                                |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia . . . . .                               | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary . . . . .                    | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey . . . . .                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel . . . . .                     | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago . . . . .                       |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine . . . . .                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan . . . . .                      | <input type="checkbox"/> UG Uganda . . . . .                                    |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America . . . . .       |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan . . . . .                            | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan . . . . .                                |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea . . . . . | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam . . . . .                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea . . . . .          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan . . . . .                 |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka . . . . .                             |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia . . . . .                               |   |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho . . . . .                               |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania . . . . .                  |   |
| <input type="checkbox"/> LU Luxembourg . . . . .                            |   |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐ . . . . .
- ☐ . . . . .
- ☐ . . . . .

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of . . . . .

The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



**Box No. VI PRIORITY CLAIM**Further priority claims are indicated in the Supplemental Box ☐

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) DE	23 November 1995 (23.11.1995)	P 195 43 649.0	
item (2) DE	24 February 1996 (24.02.1996)	P 196 07 044.9	
item (3)			

Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):

☐ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s): \_\_\_\_\_

**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / \_\_\_\_\_

Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

Country (or regional Office):

Date (day/month/year):

Number:

**Box No. VIII CHECK LIST**

This international application contains the following number of sheets:

1. request : 5 sheets  
 2. description : 39 sheets  
 3. claims : 6 sheets  
 4. abstract : 1 sheets  
 5. drawings : 9 sheets

Total : 60 sheets

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☐ separate signed power of attorney  
 2. ☐ copy of general power of attorney  
 3. ☐ statement explaining lack of signature  
 4. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):  
 5. ☒ fee calculation sheet  
 6. ☐ separate indications concerning deposited microorganisms  
 7. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette)  
 8. ☐ other (specify):

Figure No. \_\_\_\_\_ of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.

**Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH  
ppa. i.A.

(signed)

(signed)

Dr. Dieter Laudien

DI Christine Farniok

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application: 21 NOV 1996 (21.11.96)	2. Drawings:  <input checked="" type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau:





**Supplemental Box** *If the Supplemental Box is not used, this sheet need not be included in the request.*

*Use this box in the following cases:*

**1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information:**

*in particular:*

- (i) *if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available:*
- (ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked:*
- (iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America:*
- (iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents:*
- (v) *if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "Continuation" or "Continuation-in-part":*
- (vi) *if there are more than three earlier applications whose priority is claimed:*

*in such case, write "Continuation of Box No. ..." [indicate the number of the Box] and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient;*

*in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III;*

*in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*

*in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*

*in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*

*in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;*

*in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*

**2. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty:**

*in such case, write "Statement Concerning Non-Prejudicial Disclosures or Exceptions to Lack of Novelty" and furnish that statement below.*

Continuation of Box IX

SCHMIDT, Walter	(signed)
BIRNSTIEL, Max	(signed)
SCHWEIGHOFFER, Tamàs	(signed)
STEINLEIN, Peter	(signed)
BUSCHLE, Michael	(signed)



Eingang A-Patente

PATENT COOPERATION TREATY

INGELANGT

06. Juni 1997

From the INTERNATIONAL BUREAU

SB	gesehen	erledigt
12		

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

Patentstelle

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH  
Postfach 200  
D-55216 Ingelheim am Rhein  
ALLEMAGNE

ERFASST

Date of mailing (day/month/year) 29 May 1997 (29.05.97)		
Applicant's or agent's file reference 14/032		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/EP96/05126	International filing date (day/month/year) 21 November 1996 (21.11.96)	Priority date (day/month/year) 23 November 1995 (23.11.95)
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,BR,CA,CN,CZ,EP,IL,JP,KR,PL,RO,SK,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
BG,BY,EE,HU,KZ,LT,LV,MX,NZ,RU,SG,TR,UA,UZ,VN

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
29 May 1997 (29.05.97) under No. WO 97/19169

#### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

#### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 730.91.11



Eingang A-Patente

## PATENT COOPERATION TREATY

21. Juli 1997

SB	gesehen	erledigt
Fe		PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH  
Postfach 200  
D-55216 Ingelheim am Rhein  
ALLEMAGNE

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

Date of mailing (day/month/year) 11 July 1997 (11.07.97)		
Applicant's or agent's file reference 14/032		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/EP96/05126	International filing date (day/month/year) 21 November 1996 (21.11.96)	
Priority date (day/month/year) 23 November 1995 (23.11.95)		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, DE, DK, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, NZ, PL, RO, RU, SK, US, VN

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : BY, EE, HU, KZ, LT, LV, MX, SG, TR, UA, UZ

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of the annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent including, where applicable, ES which cannot be elected since it is not bound by Chapter II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Peggy Steunenbergh  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 5/08, A61K 35/14, 35/26, 39/12, 38/19, C07K 14/725</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19169</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 29. Mai 1997 (29.05.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/05126		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NZ, PL, RO, RU, SG, SK, TR, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 21. November 1996 (21.11.96)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> ✓ 195 43 649.0 23. November 1995 (23.11.95) DE ✓ 196 07 044.9 24. Februar 1996 (24.02.96) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b>			
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 2a/16, A-1030 Wien (AT). BIRNSTIEL, Max [CH/AT]; Skodagasse 14-16/15, A-1080 Wien (AT). SCHWEIGHOFFER, Tamás [HU/AT]; Colloredogasse 2/4, A-1180 Wien (AT). STEINLEIN, Peter [DE/AT]; Rembrandtstrasse 10/4, A-1020 Wien (AT). BUSCHLE, Michael [DE/AT]; Hyrtlstrasse 35/11, A-2345 Brunn/Gebirge (AT).			
<b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			
<b>(54) Title:</b> TUMOUR VACCINE AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF			
<b>(54) Bezeichnung:</b> TUMORVAKZINE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG			
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a tumour vaccine and a process for the preparation thereof. The tumour vaccine contains tumour cells, at least a portion of which has at least one MHC-I-haplotype of the patient on the cell surface, and which have been loaded in such a manner with one or a plurality of peptides bonding to the MHC-I-molecule that said tumour cells are recognised as foreign within the context of the peptides by the patient's immune system and trigger a cellular immune response. Loading takes place in the presence of a polycation such as polylysine.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Tumorvakzine und Verfahren zu deren Herstellung. Die Tumorvakzine enthält Tumorzellen, von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist, und die mit einem oder mehreren Peptiden, die an das MHC-I-Molekül binden, derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen. Die Beladung wird in Gegenwart eines Polykations wie Polylysin vorgenommen.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		



## Tumorstoffe und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Entwicklung einer therapeutischen Stoffe auf der Grundlage von Tumorzellen beruht im wesentlichen auf den folgenden Voraussetzungen: es bestehen qualitative oder quantitative Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen; das Immunsystem hat prinzipiell die Fähigkeit, diese Unterschiede zu erkennen; das Immunsystem kann - durch aktive spezifische Immunisierung mit Stoffen - dazu stimuliert werden, Tumorzellen anhand dieser Unterschiede zu erkennen und deren Abstoßung herbeizuführen.

Um eine Anti-Tumorstoff herbeizuführen, müssen zumindest zwei Voraussetzungen erfüllt sein: erstens müssen die Tumorzellen Antigene oder Neoepitope, die auf normalen Zellen nicht vorkommen, exprimieren. Zweitens muß das Immunsystem entsprechend aktiviert werden, um auf diese Antigene zu reagieren. Ein wesentliches Hindernis bei der Immuntherapie von Tumoren ist deren geringe Immunogenizität, vor allem im Menschen. Dies ist insofern überraschend, als zu erwarten wäre, daß die große Anzahl genetischer Veränderungen maligner Zellen zur Entstehung von Peptid-Neoepitopen führen sollte, die im Kontext mit MHC-I-Molekülen von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden.

In jüngerer Zeit wurden Tumor-assoziierte und Tumor-spezifische Antigene entdeckt, die solche Neo-Epitope darstellen und somit potentielle Ziele für einen Angriff des Immunsystems darstellen sollten. Daß es dem Immunsystem dennoch nicht gelingt, Tumore zu eliminieren, die diese Neo-Epitope exprimieren, dürfte demnach offensichtlich nicht am Fehlen von Neo-Epitopen gelegen sein, sondern daran, daß die immunologische Antwort auf diese Neo-Antigene unzureichend ist.

Für die Immuntherapie von Krebs auf zellulärer Basis wurden zwei allgemeine Strategien entwickelt: Einerseits die adoptive Immuntherapie, die sich der in vitro Expansion von tumorreaktiven T-Lymphozyten und deren

Wiedereinführung in den Patienten bedient; andererseits die aktive Immuntherapie, welche Tumorzellen verwendet, in der Erwartung, daß damit entweder neue oder verstärkte Immunantworten gegen Tumorantigene hervorgerufen werden, die zu einer systemischen Tumorantwort führen.

Tumorstoffe auf der Grundlage der aktiven Immuntherapie wurden auf verschiedene Arten hergestellt; ein Beispiel dafür sind bestrahlte Tumorzellen, die mit immunstimulierenden Adjuvantien wie Corynebacterium parvum oder Bacillus Calmette Guérin (BCG) versetzt werden, um Immunreaktionen gegen Tumorantigene hervorzurufen (Oettgen und Old, 1991).

In den letzten Jahren wurden vor allem genetisch modifizierte Tumorzellen für eine aktive Immuntherapie gegen Krebs verwendet, wobei die in die Tumorzellen eingeführten Fremdgene in drei Kategorien fallen:

Eine davon verwendet Tumorzellen, die genetisch modifiziert werden, um Zytokine zu produzieren. Lokale Koinzidenz von Tumorzellen und Zytokinsignal sollen einen Stimulus setzen, der Anti-Tumorimmunität auslöst. Eine Übersicht über Anwendungen dieser Strategie wird von Pardoll, 1993, Zatloukal et al., 1993, und Dranoff und Mulligan, 1995, gegeben.

Von Tumorzellen, die genetisch verändert wurden, um Zytokine wie IL-2, GM-CSF oder IFN- $\gamma$  zu sekretieren oder um co-stimulierende Moleküle zu exprimieren, wurde in experimentellen Tiermodellen gezeigt, daß sie potente Anti-Tumorimmunität generieren (Dranoff et al., 1993; Zatloukal et al., 1995). Bei einem Menschen, der bereits eine beträchtliche Tumorbelastung aufweist und eine Toleranz gegen den Tumor entwickelt hat, ist es jedoch wesentlich schwieriger, die Kaskade komplexer Wechselwirkungen vollständig zu erfassen, so daß eine wirkungsvolle Anti-Tumorreaktion stattfinden kann. Die tatsächliche Wirksamkeit von Zytokin-sekretierenden

Tumorstoffimpfungen für Anwendungen im Menschen ist noch nicht erwiesen.

Eine weitere Kategorie von Genen, mit denen Tumorzellen im Hinblick auf ihre Verwendung als Tumorstoffimpfung verändert werden, kodiert für sog. akzessorische Proteine ("accessory proteins"); das Ziel dieses Ansatzes besteht darin, Tumorzellen in Antigen-präsentierende Zellen ("Neo-APCs") umzufunktionieren, um sie direkt Tumor-spezifische T-Lymphozyten generieren zu lassen. Ein Beispiel für einen derartigen Ansatz wird von Ostrand-Rosenberg, 1994, beschrieben.

Die Identifizierung und Isolierung von Tumorstoffantigenen (TAs) bzw. davon abgeleiteter Peptide, z.B. durch Wölfel et al., 1994 a) und 1994 b); Carrel et al., 1993, Lehmann et al., 1989, Tibbets et al., 1993, oder in den veröffentlichten internationalen Anmeldungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159 beschrieben) war die Voraussetzung dafür, Tumorstoffantigene als Immunogene für Tumorstoffimpfung zu verwenden, und zwar sowohl in Form von Proteinen als auch von Peptiden. Eine Tumorstoffimpfung in Form von Tumorstoffantigenen als solchen ist jedoch nicht ausreichend immunogen, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, wie sie zur Eliminierung von Tumorstoffantigen tragenden Tumorzellen erforderlich wäre; auch die co-Applikation von Adjuvantien bietet nur bedingte Möglichkeiten zur Verstärkung der Immunantwort (Oettgen und Old, 1991).

Eine dritte Strategie der aktiven Immuntherapie zur Steigerung der Wirksamkeit von Tumorstoffimpfungen basiert auf xenogenisierten (verfremdeten) autologen Tumorzellen. Diesem Konzept liegt die Annahme zugrunde, daß das Immunsystem auf Tumorzellen reagiert, die ein Fremdprotein exprimieren und daß im Zuge dieser Reaktion auch eine Immunantwort gegen diejenigen Tumorstoffantigene (TAs) hervorgerufen wird, die von den Tumorzellen der Impfung präsentiert werden.

Eine Übersicht über diese verschiedenen Ansätze, bei denen Tumorzellen im Hinblick auf eine verstärkte Immunogenizität durch Einführung verschiedener Gene verfremdet werden, wird von Zatloukal et al., 1993, gegeben.

Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der spezifischen Immunantwort spielt ist ein trimolekularer Komplex, bestehend aus den Komponenten T-Zell-Antigenrezeptor, MHC ("Major Histocompatibility Complex")-Molekül und dessen Liganden, der ein von einem Protein abgeleitetes Peptidfragment ist.

MHC-I-Moleküle (bzw. die entsprechenden humanen Moleküle, die HLAs) sind Peptidrezeptoren, die bei stringenter Spezifität die Bindung von Millionen verschiedener Liganden erlauben. Die Voraussetzung dafür stellen Allel-spezifische Peptidmotive dar, die folgende Spezifitätskriterien aufweisen: Die Peptide haben, in Abhängigkeit vom MHC-I-Haplotyp, eine definierte Länge, in der Regel acht bis zehn Aminosäurereste. Typischerweise stellen zwei der Aminosäurepositionen sog. "Anker" dar, die nur durch eine einzige Aminosäure oder durch Aminosäure-Reste mit eng verwandten Seitenketten besetzt werden können. Die genaue Lage der Ankeramino-säuren im Peptid und die Anforderungen an deren Eigenschaften variieren mit den MHC-I-Haplotypen. Der C-Terminus der Peptid-Liganden ist häufig ein aliphatischer oder ein geladener Rest. Solche allelspezifische MHC-I-Peptid-Ligandenmotive sind bisher u.a. für H-2K<sup>d</sup>, K<sup>b</sup>, K<sup>k</sup>, K<sup>km1</sup>, D<sup>b</sup>, HLA-A\*0201, A\*0205 und B\*2705 bekannt.

Im Rahmen des Proteinumsatzes innerhalb der Zelle werden reguläre, entartete und fremde Genprodukte, z.B. virale Proteine oder Tumorantigene, in kleine Peptide zerlegt; einige davon stellen potentielle Liganden für MHC-I-Moleküle dar. Damit ist die Voraussetzung für deren Präsentation durch MHC-Moleküle und als Folge davon die Auslösung einer zellulären Immunantwort gegeben, wobei

noch nicht im einzelnen aufgeklärt ist, wie die Peptide als MHC-I-Liganden in der Zelle produziert werden.

Ein Ansatz, der sich diesen Mechanismus für die Verfremdung von Tumorzellen im Hinblick auf eine Verstärkung der Immunantwort zunutze macht, besteht darin, Tumorzellen mit mutagenen Chemikalien, wie N-Methyl-N'-nitrosoguanidin zu behandeln. Dies soll dazu führen, daß die Tumorzellen von mutierten Varianten zellulärer Proteine abgeleitete Neo-Antigene präsentieren, die fremde Genprodukte darstellen (Van Pel und Boon, 1982). Da jedoch die mutagenen Ereignisse zufällig über das Genom verteilt sind und außerdem zu erwarten ist, daß einzelne Zellen infolge unterschiedlicher mutagener Ereignisse auch unterschiedliche Neo-Antigene präsentieren, ist dieses Verfahren in qualitativer und quantitativer Hinsicht schwierig zu kontrollieren.

Ein anderer Ansatz verfremdet Tumorzellen dadurch, daß sie mit Genen eines oder mehrerer Fremdproteine, z.B. dem eines fremden MHC-I-Moleküls oder MHC-Proteine unterschiedlichen Haplotyps, transfiziert werden, das dann in Form an der Zelloberfläche aufscheint (EP-A2 0 569 678; Plautz et al., 1993; Nabel et al., 1993). Dieser Ansatz beruht auf der oben erwähnten Vorstellung, daß die Tumorzellen, wenn sie in Form einer Ganzzell-Vakzine verabreicht werden, anhand des exprimierten Proteins bzw. der davon abgeleiteten Peptide als fremd erkannt werden, oder daß, im Fall der Expression von autologen MHC-I-Molekülen, durch eine erhöhte Anzahl von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche die Präsentation von Tumorantigen optimiert wird. Die Veränderung von Tumorzellen mit einem Fremdprotein kann dazu führen, daß die Zellen vom Fremdprotein stammende Peptide im MHC-Kontext präsentieren und die Veränderung von "selbst" zu "fremd" im Rahmen der MHC-Peptid-Komplex Erkennung stattfindet. Die Erkennung eines Proteins oder Peptids als fremd hat zur Folge, daß im Zuge der Immunerkennung nicht nur gegen das fremde Protein, sondern auch gegen

die den Tumorzellen eigenen Tumorantigene eine Immunantwort erzeugt wird. Im Zuge dieses Prozesses werden die Antigen-präsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APCs) aktiviert, die die in der Tumorzelle des Vakzins vorkommenden Proteine (inklusive TAs) zu Peptiden prozessieren und als Liganden für ihre eigenen MHC-I und MHC-II-Moleküle verwenden. Die aktivierten, Peptid-beladenen APCs wandern in die Lymphknoten ein, wo einige wenige der naiven T-Lymphozyten die vom TA stammenden Peptide auf den APCs erkennen und als Stimulus zur klonale Expansion - mit anderen Worten zur Generierung von Tumor-spezifischen CTLs und T-Helferzellen - verwenden können.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine neue Tumorstoffimpfung auf der Grundlage verfremdeter Tumorzellen bereitzustellen, mit Hilfe derer eine wirksame zelluläre Anti-Tumorimmunantwort ausgelöst werden kann.

Bei der Lösung der gestellten Aufgabe wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen: Während nicht-maligne, normale Körperzellen vom Immunsystem toleriert werden, reagiert der Körper auf eine normale Zelle, wenn sie, z.B. aufgrund einer Virusinfektion, körperfremde Proteine synthetisiert, mit einer Immunabwehr. Die Ursache dafür ist darin gelegen, daß die MHC-I-Moleküle Fremdpeptide präsentieren, die von den körperfremden Proteinen stammen. Als Folge davon registriert das Immunsystem, daß etwas Unerwünschtes, Fremdes mit dieser Zelle geschehen ist. Die Zelle wird eliminiert, APCs werden aktiviert und eine neue, spezifische Immunität gegen die Fremdproteine exprimierenden Zellen generiert.

Tumorzellen enthalten zwar die jeweiligen tumorspezifischen Tumorantigene, sind aber als solche unzulängliche Vakzine, weil sie aufgrund ihrer geringen Immunogenizität vom Immunsystem ignoriert werden. Belädt man nun, im Gegensatz zu den bekannten Ansätzen, eine

Tumorzelle nicht mit einem Fremdprotein, sondern mit einem Fremdpeptid, so werden zusätzlich zu den Fremdpeptiden auch die zelleigenen Tumorantigene von dieser Zelle als fremd wahrgenommen. Durch die Verfremdung mit einem Peptid soll erreicht werden können, daß sich die durch die Fremdpeptide ausgelöste zelluläre Immunantwort gegen die Tumorantigene richtet.

Die Ursache für die geringe Immunogenizität von Tumorzellen kann nicht ein qualitatives, sondern ein quantitatives Problem sein. Für ein von einem Tumorantigen abgeleitetes Peptid kann das bedeuten, daß es zwar von MHC-I-Molekülen präsentiert wird, jedoch in einer Konzentration, die zu gering ist, um eine zelluläre tumorspezifische Immunantwort auszulösen. Eine Erhöhung der Zahl von tumorspezifischen Peptiden auf der Tumorzelle sollte somit ebenfalls eine Verfremdung der Tumorzelle bewirken, die zur Auslösung einer zellulären Immunantwort führt. Im Gegensatz zu Ansätzen, bei denen das Tumorantigen bzw. das davon abgeleitete Peptid dadurch auf der Zelloberfläche präsentiert wird, daß es mit einer für das betreffende Protein bzw. Peptid kodierenden DNA transfiziert wurde, wie in den internationalen Veröffentlichungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031 und WO 95/00159, beschrieben, sollte eine Vakzine bereitgestellt werden, die bei einfacherer Herstellung eine effiziente Immunantwort auslöst.

Von Mandelboim et al., 1994 und 1995, wurde vorgeschlagen, RMA-S-Zellen mit von Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden zu inkubieren, um damit eine zelluläre Immunantwort gegen die entsprechenden patienteneigenen Tumorantigene auszulösen. Von den von Mandelboim et al. für die Tumorstimmung vorgeschlagenen Zellen der Bezeichnung RMA-S (Kärre et al., 1986) wird angenommen, daß sie Funktionen von APCs ausführen können. Sie haben die Eigenart, daß ihre HLA-Moleküle an der Zelloberfläche infolge eines Defekts im zellulären TAP-Mechanismus ("Transport of Antigenic

Peptides"; verantwortlich für die Prozessierung von Peptiden und deren Bindung an HLA-Moleküle) leer sind. Damit stehen die Zellen für die Beladung mit einem Peptid zur Verfügung, sie fungieren also gleichsam als Präsentiervehikel für das von außen angebotene Peptid. Die erzielte Anti-Tumorwirkung beruht auf der Auslösung einer Immunantwort gegen das auf den Zellen präsentierte Peptid, das dem Immunsystem ohne unmittelbaren Kontext mit dem antigenen Repertoire der Tumorzelle angeboten wird.

Die Erfindung betrifft eine Tumorstoffimpfung für die Verabreichung an einem Patienten, bestehend aus Tumorzellen, die von sich aus von Tumorstoffantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist und die mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen, wobei die Peptide

- a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam ist, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder
- b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von Tumorstoffantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden und in einer Konzentration auf den Tumorzellen der Stoffimpfung vorliegen, die höher ist als die Konzentration eines Peptids, das von demselben Tumorstoffantigen abgeleitet ist wie das auf den Tumorzellen des Patienten exprimierte.



Die humanen MHC-Moleküle werden gemäß den internationalen Gepflogenheiten im folgenden auch als "HLA" ("Human Leucocyte Antigen") bezeichnet.

Unter "zelluläre Immunantwort" ist die zytotoxische T-Zellimmunität zu verstehen, die als Folge der Generierung von tumorspezifischen zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen und CD4-positiven Helfer-T-Zellen die Zerstörung der Tumorzellen bewirkt.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Vakzine aus Tumorzellen beruht vor allem darauf, daß die immunogene Wirkung des auf den Tumorzellen vorhandenen Vorrats an Tumorantigenen durch das Peptid verstärkt wird.

Die Peptide des Typs a) werden im folgenden auch als "Fremdpeptide" oder "Xenopeptide" bezeichnet.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen der Vakzine autolog. Dabei handelt es sich um Zellen, die dem zu behandelnden Patienten entnommen werden, ex vivo mit Peptid(en) a) und/oder b) behandelt, gegebenenfalls inaktiviert und danach dem Patienten wieder verabreicht werden. (Methoden zur Herstellung von autologen Tumorstoffen sind in der WO 94/21808, auf deren Offenbarung Bezug genommen wird, beschrieben).

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen allogene, d.h. sie stammen nicht von dem zu behandelnden Patienten. Der Verwendung von allopathen Zellen wird vor allem dann der Vorzug gegeben, wenn arbeitsökonomische Überlegungen eine Rolle spielen; die Herstellung von individuellen Vakzinen für jeden einzelnen Patienten ist arbeits- und kostenaufwendig, außerdem treten bei einzelnen Patienten Schwierigkeiten bei der ex vivo Kultivierung der Tumorzellen auf, so daß Tumorzellen nicht in ausreichend großer Zahl erhalten werden, um eine Vakzine herstellen zu können. Bei den allopathen Tumorzellen ist zu berücksichtigen, daß sie auf den HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt sein müssen.

Im Falle der Verwendung von Fremdpeptiden der Kategorie a) handelt es sich bei allogenen Tumorzellen um Zellen einer oder mehrerer Zelllinien, von denen zumindest eine Zelllinie mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorantigene exprimiert, die identisch sind mit den Tumorantigenen des zu behandelnden Patienten, d.h. die Tumorstoffe werden auf die Tumorstoffe des Patienten abgestimmt. Dadurch wird gewährleistet, daß die durch das MHC-I-präsentierten Fremdpeptide auf den Tumorzellen der Vakzine ausgelöste zelluläre Immunantwort, die zur Expansion von tumorspezifischen CTLs und T-Helferzellen führt, sich auch gegen die Tumorzellen des Patienten richtet, weil diese dasselbe Tumorantigen exprimieren wie die Zellen der Vakzine.

Soll z.B. eine Patientin mit der erfindungsgemäßen Tumorstoffe behandelt werden, die an Brustkrebs-Metastasen leidet, die eine Her2/neu-Mutation (Allred et al., 1992; Peopoles et al., 1994; Yoshino et al., 1994 a); Stein et al., 1994; Yoshino et al., 1994 b); Fisk et al., 1995; Han et al., 1995) aufweisen, werden als Vakzine allogene, auf den HLA-Haplotyp des Patienten abgestimmte Tumorzellen eingesetzt, die ebenfalls das mutierte Her2/neu als Tumorantigen exprimieren. In jüngerer Zeit wurden zahlreiche Tumorantigene isoliert und ihr Zusammenhang mit einer oder mehreren Krebserkrankungen aufgeklärt. Weitere Beispiele für solche Tumorantigene sind ras (Fenton et al., 1993; Gedde Dahl et al., 1992; Jung et al., 1991; Morishita et al., 1993; Peace et al., 1991; Skipper et al., 1993), MAGE-Tumorantigene (Boon et al., 1994; Slingluff et al., 1994; van der Bruggen et al., 1994; WO 92/20356); eine Übersicht über diverse Tumorantigene wird darüberhinaus von Carrel et al., 1993 gegeben.

Eine Übersicht über bekannte, im Rahmen der Erfindung verwendbare Tumorantigene und davon abgeleitete Peptide ist in der Tabelle gegeben.

Die Tumorantigene des Patienten werden im allgemeinen im Zuge der Erstellung von Diagnose und Therapieplan mit Standardmethoden, z.B. mit Hilfe von Assays auf der Grundlage von CTLs mit Spezifität für das zu bestimmende Tumorantigen bestimmt. Derartige Assays wurden u.a. von Hérin et al, 1987; Coulie et al., 1993; Cox et al., 1994; Rivoltini et al., 1995; Kawakami et al., 1995; sowie in der WO 94/14459 beschrieben; diesen Literaturstellen sind auch verschiedene Tumorantigene bzw. davon abgeleitete Peptid epitope entnehmbar. Auf der Zelloberfläche auftretende Tumorantigene können auch mit Immunoassays auf Basis von Antikörpern nachgewiesen werden. Wenn die Tumorantigene Enzyme sind, z.B. Tyrosinasen, können sie mit Enzymassays nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann eine Mischung von autologen und allogenen Tumorzellen als Ausgangsmaterial für die Vakzine verwendet werden. Diese Ausführungsform der Erfindung kommt insbesondere dann zur Anwendung, wenn die vom Patienten exprimierten Tumorantigene unbekannt oder nur unvollständig charakterisiert sind und/oder wenn die allogenen Tumorzellen nur einen Teil der Tumorantigene des Patienten exprimieren. Durch Beimischung von autologen, mit dem Fremdpeptid behandelten Tumorzellen wird gewährleistet, daß zumindest ein Teil der Tumorzellen der Vakzine eine möglichst große Anzahl von patienteneigenen Tumorantigenen enthält. Bei den allogenen Tumorzellen handelt es sich um solche, die in einem oder mehreren MHC-I-Haplotypen mit dem Patienten übereinstimmen.

Die Peptide des Typs a) und b) werden entsprechend der Anforderung, an ein MHC-I-Molekül zu binden, hinsichtlich ihrer Sequenz durch den HLA-Subtyp des Patienten definiert, dem die Vakzine verabreicht werden soll. Die Bestimmung des HLA-Subtyps des Patienten stellt somit eine der wesentlichen Voraussetzungen für

die Auswahl bzw. Konstruktion eines geeigneten Peptids dar.

Bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Tumorstoffvakzine in Form autologer Tumorzellen ergibt sich der HLA-Subtyp automatisch durch die beim Patienten genetisch determinierte Spezifität des HLA-Moleküls. Der HLA-Subtyp des Patienten kann mit Standardmethoden, wie dem Mikro-Lymphotoxizitätstest (MLC-Test, Mixed Lymphocyte Culture) bestimmt werden (Practical Immunol., 1989). Der MLC-Test beruht auf dem Prinzip, aus Patientenblut isolierte Lymphozyten zunächst mit Antiserum oder einem monoklonalen Antikörper gegen ein bestimmtes HLA-Molekül in Gegenwart von Kaninchen-Komplement (C) zu versetzen. Positive Zellen werden lysiert und nehmen einen Indikator-Farbstoff auf, während unbeschädigte Zellen ungefärbt bleiben.

Zur Bestimmung des HLA-Haplotyps eines Patienten kann auch die RT-PCR herangezogen werden (Curr. Prot. Mol. Biol. Kapitel 2 und 15). Dazu entnimmt man einem Patienten Blut und isoliert daraus RNA. Diese RNA unterwirft man zunächst einer Reversen Transkription, wodurch cDNA des Patienten entsteht. Die cDNA dient als Matrize für die Polymerasekettenreaktion mit Primerpaaren, die spezifisch die Amplifikation eines DNA-Fragmentes bewirken, das für einen bestimmten HLA-Haplotyp steht. Erscheint nach Agarosegelelektrophorese eine DNA-Bande, exprimiert der Patient das entsprechende HLA-Molekül. Erscheint die Bande nicht, ist der Patient dafür negativ. Für jeden Patienten sind mindestens zwei Banden zu erwarten.

Bei der Anwendung der Erfindung in Form einer allogenen Vakzine werden Zellen verwendet, von denen zumindest ein Teil auf mindestens einen HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt ist. Im Hinblick auf eine möglichst breite Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Vakzine wird zweckmäßig von einer Mischung verschiedener Zelllinien ausgegangen, die zwei oder drei verschiedene der am

häufigsten vertretenen HLA-Subtypen exprimieren, wobei insbesondere die Haplotypen HLA-A1 und HLA-A2 berücksichtigt werden. Mit einer Vakzine auf der Grundlage einer Mischung von allogenen Tumorzellen, die diese Haplotypen exprimieren, kann auf eine breite Patientenpopulation erfaßt werden; damit können ca. 70 % der europäischen Bevölkerung abgedeckt werden (Mackiewicz et al., 1995).

Die Definition der erfindungsgemäß verwendeten Peptide durch den HLA-Subtyp bestimmt diese hinsichtlich ihrer Ankeramino-säuren und ihrer Länge; definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß die Peptide in die Peptid-Bindungsfurche der jeweiligen HLA-Moleküle passen somit auf der Zelloberfläche der die Vakzine bildenden Tumorzellen derart präsentiert werden, daß die Zellen als fremd erkannt werden. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion auch gegen die Tumorzellen des Patienten erzeugt wird.

Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Fremdpeptide gemäß Kategorie a) geeignet sind, sind in einer großen Bandbreite verfügbar. Ihre Sequenz kann von natürlich vorkommenden immunogenen Proteinen bzw. deren zellulären Abbauprodukten, z.B. von viralen oder bakteriellen Peptiden, oder von patientenfremden Tumorantigenen abgeleitet sein.

Geeignete Fremdpeptide können z.B. auf der Grundlage von literaturbekannten Peptidsequenzen ausgewählt werden; z.B. anhand der von Rammensee et. al., 1993, Falk et al., 1991, für die unterschiedlichen HLA-Motive beschriebenen, von immunogenen Proteinen verschiedenen Ursprungs abgeleiteten Peptide, die in die Bindungsfurchen der Moleküle der jeweiligen HLA-Subtypen passen. Für Peptide, die eine Teilsequenz eines Proteins mit immunogener Wirkung aufweisen, kann anhand der bereits bekannten oder gegebenenfalls noch zu bestimmenden Polypeptidsequenzen durch Sequenzabgleich unter

Berücksichtigung der HLA-spezifischen Anforderungen festgestellt werden, welche Peptide geeignete Kandidaten darstellen. Beispiele für geeignete Peptide finden sich z.B. bei Rammensee et al., 1993, Falk et al., 1991, und Rammensee, 1995; sowie in der WO 91/09869 (HIV-Peptide); von Tumorantigenen abgeleitete Peptide wurden u.a. in den veröffentlichten internationalen Patentanmeldungen WO 95/00159, WO 94/05304 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Literaturstellen und der darin im Zusammenhang mit Peptiden zitierten Artikel wird Bezug genommen.

Bevorzugte Kandidaten für Xenopeptide sind Peptide, deren Immunogenität bereits gezeigt wurde, also Peptide, die von bekannten Immunogenen, z.B. viralen oder bakteriellen Proteinen, abgeleitet sind. Solche Peptide zeigen aufgrund ihrer Immunogenizität eine heftige Reaktion im MLC-Test.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, also Peptide, die unverändert von natürlichen Proteinen abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge beliebige Variationen vorgenommen werden, in diesem Fall werden also erfindungsgemäß künstliche Peptide verwendet, die entsprechend den Anforderungen an einen MHC-I-Liganden entworfen sind. So können z.B. ausgehend vom H2-K<sup>d</sup>-Liganden Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile (LFEAIEGFI) die Aminosäuren, die keine Ankeraminosäuren darstellen, geändert werden, um das Peptid der Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile (FFIGALEEI) zu erhalten; außerdem kann die Ankeraminosäure Ile an Position 9 durch Leu ersetzt werden.

Peptide, die von Tumorantigenen, also von Proteinen, die in einer Tumorzelle exprimiert werden und die in der entsprechenden nicht-transformierten Zelle nicht oder in signifikant geringerer Konzentration aufscheinen, abgeleitet sind, können im Rahmen der vorliegenden

Erfindung als Peptide des Typs a) und/oder des Typs b) verwendet werden.

Die Länge des Peptids entspricht vorzugsweise der bzgl. der Bindung an das MHC-I-Molekül erforderlichen Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeraminosäuren. Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit nicht beeinträchtigt, bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann das Peptid mit negativ geladenen Aminosäuren verlängert werden, oder es können negativ geladene Aminosäuren in das Peptid, und zwar an anderen Positionen als den Ankeraminosäuren, eingebaut werden, um eine elektrostatische Bindung des Peptids an ein Polykation, wie Polylysin, zu erreichen.

Unter den Begriff "Peptide" fallen im Rahmen der vorliegenden Erfindung definitionsgemäß auch größere Proteinfragmente bzw. ganze Proteine, von denen gewährleistet ist, daß sie nach der Applikation von den APCs zu Peptiden prozessiert werden, die an das MHC-Molekül passen.

In dieser Ausführungsform wird das Antigen somit nicht in Form eines Peptids, sondern als Protein oder Proteinfragment bzw. als Gemisch von Proteinen oder Proteinfragmenten eingesetzt. Das Protein stellt ein Antigen bzw. Tumorantigen dar, von dem die nach Prozessierung erhaltenen Bruchstücke abgeleitet sind. Die von den Zellen aufgenommenen Proteine bzw. Proteinfragmente werden prozessiert und können danach im MHC-Kontext den Immuneffektorzellen präsentiert werden und somit eine Immunantwort auslösen bzw. verstärken (Braciale und Braciale, 1991; Kovacsovics Bankowski und Rock, 1995; York und Rock, 1996).

Im Fall der Verwendung von Proteinen oder Proteinfragmenten kann man die Identität des prozessierten Endproduktes mittels chemischer Analyse (Edman-Abbau oder Massenspektrometrie von prozessierten Fragmenten; vgl. den Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995 sowie die darin zitierte Originalliteratur) oder biologischen Assays (Fähigkeit der APCs zur Stimulation von T-Zellen, die für die prozessierten Fragmente spezifisch sind), nachweisen.

Die Auswahl von Peptid-Kandidaten im Hinblick auf ihre Eignung als Fremdpeptide erfolgt prinzipiell in mehreren Stufen: Im allgemeinen werden die Kandidaten, zweckmäßig in Serienversuchen, zunächst in einem Peptid-Bindungstest auf ihre Bindungsfähigkeit an ein MHC-I-Molekül getestet.

Ein geeignete Untersuchungsmethode ist z.B. die auf der Durchflußzytometrie beruhende FACS-Analyse (Flow Cytometry, 1989; FACS Vantage TM User's Guide, 1994; CELL Quest TM User's Guide, 1994). Dabei wird das Peptid mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, z.B. mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und auf Tumorzellen aufgebracht, die das jeweilige MHC-I-Molekül exprimieren. Im Durchfluß werden einzelne Zellen von einem Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt; die emittierte Fluoreszenz wird gemessen, sie ist abhängig von der an die Zelle gebundene Peptidmenge.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der gebundenen Peptidmenge ist der Scatchard-Blot. Man benutzt dazu Peptid, das mit  $J^{125}$  oder mit Seltenerdmetallionen (z.B. Europium) markiert ist. Man belädt die Zellen bei 4°C mit verschiedenen, definierten Konzentrationen von Peptid für 30 bis 240 min. Zur Bestimmung unspezifischer Wechselwirkung von Peptid mit Zellen wird zu einigen Proben ein Überschuß nicht-markierten Peptides zugesetzt, der die spezifische Interaktion des markierten Peptids unterbindet. Anschließend wäscht man die Zellen, damit unspezifisch zell-assoziiertes



Material entfernt wird. Die Menge des zell-gebundenen Peptids wird nun entweder in einem Szintillationszähler anhand der emittierten Radioaktivität, oder in einem zur Messung langlebiger Fluoreszenz geeigneten Photometer ermittelt. Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgt nach Standardmethoden.

In einem zweiten Schritt werden Kandidaten mit guten Bindungsqualitäten auf ihre Immunogenizität geprüft.

Die Immunogenizität von Xenopeptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, deren immunogene Wirkung nicht bekannt ist, kann z.B. im MLC-Test getestet werden. Peptide, die in diesem Test, der zweckmäßig ebenfalls in Serie mit unterschiedlichen Peptiden durchgeführt wird, wobei zweckmäßig als Standard ein Peptid mit bekannt immunogener Wirkung verwendet wird, eine besonders heftige Reaktion hervorrufen, sind für die vorliegenden Erfindung geeignet.

Eine weitere Möglichkeit für die Testung von MHC-I-bindenden Peptidkandidaten auf ihre Immunogenizität besteht darin, die Bindung der Peptide an T2-Zellen zu untersuchen. Ein solcher Test beruht auf der Eigenart von T2-Zellen (Alexander et al., 1989 oder RMA-S-Zellen (Kärre et al., 1986), defekt im TAP-Peptid-Transportmechanismus zu sein und erst dann stabil MHC-I-Moleküle zu präsentieren, wenn man auf sie Peptide aufbringt, die im MHC-I-Kontext präsentiert werden. Für den Test werden z.B. T2-Zellen oder RMA-S-Zellen verwendet, die stabil mit einem HLA-Gen, z.B. mit HLA-A1- und/oder HLA-A2-Genen transfiziert sind. Werden die Zellen mit Peptiden beaufschlagt, die gute MHC-I-Liganden sind, indem sie im MHC-I-Kontext so präsentiert werden, daß sie vom Immunsystem als fremd erkannt werden können, bewirken solche Peptide, daß die HLA-Moleküle in signifikanter Menge auf der Zelloberfläche aufscheinen. Der Nachweis der HLAs auf der Zelloberfläche, z.B. mittels monoklonalen Antikörpern, erlaubt die Identifizierung geeigneter Peptide (Malnati et al.,

1995; Sykulev et al., 1994). Auch hier wird zweckmäßig ein Standardpeptid mit bekannt guter HLA- bzw. MHC-Bindungsfähigkeit verwendet.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine autologe oder allogene Tumorzelle der Vakzine mehrere Xenopeptide unterschiedlicher Sequenz aufweisen. Die verwendeten Peptide können sich in diesem Fall einerseits dahingehend unterscheiden, daß sie an unterschiedliche HLA-Subtypen binden. Damit kann erreicht werden, daß mehrere bzw. sämtliche HLA-Subtypen eines Patienten oder einer größeren Gruppe von Patienten erfaßt werden. Die Vakzine wird in bestrahlter Form verabreicht.

Eine weitere, gegebenenfalls zusätzliche, Variabilität hinsichtlich der auf der Tumorzelle präsentierten Xenopeptide kann darin bestehen, daß Peptide, die an einen bestimmten HLA-Subtyp binden, sich hinsichtlich ihrer nicht für die HLA-Bindung maßgeblichen Sequenz unterscheiden, indem sie z.B. von Proteinen unterschiedlichen Ursprungs, z.B. von viralen und/oder bakteriellen Proteinen, abgeleitet sind. Von einer solchen Variabilität, die dem vakzinierten Organismus eine größere Bandbreite an Verfremdung anbietet, kann eine Verstärkung der Stimulierung der Immunantwort erwartet werden.

In der Ausführungsform der Erfindung, bei der die Tumorstoffe aus einer Mischung von allogenen Tumorzellen verschiedener Zelllinien sowie gegebenenfalls zusätzlich autologen Tumorzellen besteht, können sämtliche Tumorzellen mit demselben/denselben Peptid(en) behandelt worden sein bzw. können die Tumorzellen verschiedenen Ursprungs auch jeweils verschiedene Xenopeptide aufweisen.

In den im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuchen wurde als Fremdpeptid des Typs a) ein virales Peptid der Sequenz Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile verwendet, das sich vom Influenza-Virus

Haemagglutinin ableitet und ein H2-K<sup>d</sup>-Ligand ist; die Ankeramminosäuren sind unterstrichen.

Mit diesem natürlich vorkommenden viralen Peptid als Fremdpeptid wurde eine Tumorstoffimpfung hergestellt und im Tiermodell (Melanommodell und Colonkarzinommodell) getestet.

Ein weiteres virales Peptid der Sequenz Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met, das sich vom Nukleoprotein von Influenzavirus ableitet und ein Ligand des HLA-1-Haplotyps H2-K<sup>b</sup>-ist (Rammensee et. al., 1993; Ankeramminosäuren sind unterstrichen), wurde für die Herstellung einer Tumorstoffimpfung verwendet; die Schutzwirkung der Stoffimpfung wurde in einem anderen Melanommodell bestätigt.

Eine weitere Stoffimpfung wurde hergestellt, indem Tumorzellen mit einem Fremdpeptid der Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile (FFIGALEEI) verfremdet wurden. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches, in der Natur bisher nicht bekanntes Peptid. Bei der Auswahl der Sequenz wurde darauf geachtet, daß die Anforderungen bezüglich der Eignung als Ligand für das MHC-I-Molekül vom Typ H2-K<sup>d</sup> erfüllt sind. Die Eignung des Peptides zur Erzeugung einer Antitumor-Immunität nach dem Konzept der aktiven Immuntherapie wurde am murinen Colon-Karzinom CT-26 (syngeneisch für den Mausstamm Balb/c) bestätigt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Tumorstoffimpfung außerdem autologe und/oder allogene Tumorzellen und/oder Fibroblasten enthalten, die mit Zytokinen transfiziert sind. In der WO 94/21808 sowie von Schmidt et al., 1995 (auf diese Veröffentlichung wird Bezug genommen) sind effiziente Tumorstoffimpfungen

beschrieben, die mittels der als "Transferrinfektion" bezeichneten DNA-Transport-Methode mit einem IL-2 Expressionsvektor erzeugt wurden (diese Methode beruht auf der Rezeptor-vermittelten Endozytose und benutzt einen mit einem Polykation, wie Polylysin, konjugierten zellulären Liganden, insbesondere Transferrin, zur Komplexierung von DNA, sowie ein endosomolytisch wirksames Agens wie Adenovirus).

Vorzugsweise mischt man die Peptid-behandelten Tumorzellen und die Zytokin exprimierenden Zellen im Verhältnis 1:1. Wenn man z.B. eine IL-2 Vakzine, die 4.000 Einheiten IL-2 pro  $1 \times 10^6$  Zellen produziert, mit  $1 \times 10^6$  Peptid-behandelten Tumorzellen mischt, kann die so erhaltene Vakzine für zwei Behandlungen eingesetzt werden, wobei ein Dosisoptimum von 1.000 bis 2.000 Einheiten IL-2 (Schmidt et al., 1995) angenommen wurde.

Durch die Kombination der Zytokin-Vakzine mit den Peptid-behandelten Tumorzellen können vorteilhaft die Wirkungen dieser beiden Vakzine-Typen vereinigt werden.

Die Aufarbeitung der Zellen sowie die Formulierung der erfindungsgemäßen Vakzine erfolgt in herkömmlicher Weise, wie z.B. in Biologic Therapy of Cancer, 1991, oder in der WO 94/21808 beschrieben.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung einer Tumorstoffvakzine bestehend aus Tumorstoffzellen zur Verabreichung an einen Patienten.

Das Verfahren ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorstoffzellen, die von sich aus von Tumorstoffantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten exprimiert, mit einem oder mehreren Peptiden behandelt, die

- a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorstoffzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und verschieden sind von Peptiden,

die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder die

- b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von Tumorantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden,

wobei man die Tumorzellen mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) so lange und in einer solchen Menge in Gegenwart eines organischen Polykations inkubiert, bis die Peptide an die Tumorzellen derart gebunden sind, daß sie im Kontext mit den Tumorzellen vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

Die Menge an Peptid beträgt vorzugsweise ca. 50 µg bis ca. 160 µg pro  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen. Im Falle der Verwendung eines Peptids der Kategorie b) kann die Konzentration auch höher sein. Für diese Peptide ist es wesentlich, daß ihre Konzentration auf den Tumorzellen der Vakzine gegenüber der Konzentration eines Peptids auf den Tumorzellen des Patienten, das von demselben Tumorantigen abgeleitet ist, derart erhöht ist, daß die Tumorzellen der Vakzine als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

Zu geeigneten Polykationen zählen homologe organische Polykationen wie Polylysin, Polyarginin, Polyornithin oder heterologe Polykationen mit zwei oder mehr unterschiedlichen positiv geladenen Aminosäuren, wobei diese Polykationen verschiedene Kettenlänge aufweisen können, ferner nicht-peptidische synthetische Polykationen wie Polyethylenimine, natürliche DNA-bindende Proteine polykationischen Charakters wie Histone oder Protamine bzw. Analoge oder Fragmente davon, sowie Spermin oder Spermidine. Zu im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten organischen Polykationen zählen auch polykationische Lipide (Felgner et al, 1994; Loeffler et al., 1993; Remy et al., 1994;

Behr, 1994), die u.a. kommerziell als Transfectam, Lipofectamin oder Lipofectin erhältlich sind.

Als Polykation wird bevorzugt Polylysin (pL) einer Kettenlänge von ca. 30 bis ca. 300 Lysinresten eingesetzt.

Die erforderliche Menge an Polykation im Verhältnis zum Peptid kann im einzelnen empirisch bestimmt werden. Im Falle der Verwendung von Polylysin und Xenopeptiden der Kategorie a) beträgt das Masseverhältnis pL:Peptid vorzugsweise ca. 1:4 bis ca 1:12.

Die Dauer der Inkubation beträgt im allgemeinen 30 min bis 4 h. Sie richtet sich danach, zu welchem Zeitpunkt die maximale Beladung mit dem Peptid erreicht ist; der Beladungsgrad kann mittels FACS-Analyse verfolgt und auf diese Weise die erforderliche Inkubationsdauer ermittelt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das Polylysin in zumindest teilweiser konjugierter Form eingesetzt. Vorzugsweise liegt ein Teil des Polylysins in mit Transferrin (Tf) konjugierter Form (Transferrin-Polylysin-Konjugat TfpL, diesbezüglich wird ebenfalls auf die Offenbarung der WO 94/21808 Bezug genommen) vor, wobei das Masseverhältnis pL:TfpL vorzugsweise ca. 1:1 beträgt.

Statt mit Transferrin kann Polylysin mit anderen Proteinen, z.B. den in der WO 94/21808 als Internalisierungsfaktoren beschriebenen zellulären Liganden, konjugiert werden.

Gegebenfalls findet die Behandlung der Tumorzellen außerdem in Gegenwart von DNA statt. Die DNA liegt zweckmäßig als Plasmid vor, vorzugsweise als Plasmid, das frei ist von Sequenzen, die für funktionelle eukaryotische Proteine kodieren, also als Leervektor. Als DNA kann prinzipiell jedes gängige, funktionell erhältliche Plasmid verwendet werden.

Die Menge an DNA im Verhältnis zu dem, gegebenenfalls teilweise mit einem Protein konjugierten Polykation, z.B. zu pL, TfpL oder einer Mischung von pL mit TfpL, beträgt vorzugsweise ca. 1:2 bis ca.1:5.

Die Dauer der Inkubation, die Menge und Art des Polykations im Verhältnis zu der Zahl der Tumorzellen und/oder der Menge an Peptid, ob bzw. in welchem Anteil das Polykation bzw. mit welchem Protein es vorteilhaft konjugiert ist, der Vorteil der Anwesenheit von DNA bzw. deren Menge können empirisch bestimmt werden. Dazu werden die einzelnen Verfahrensparameter variiert und die Peptide unter ansonsten identischen Bedingungen auf die Tumorzellen aufgebracht und überprüft, wie effizient die Peptide an die Tumorzellen gebunden haben. Eine geeignete Methode dafür ist die FACS-Analyse.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außer zur Behandlung von Tumorzellen auch zur Behandlung anderer Zellen.

Statt Tumorzellen können autologe, also patienteneigene, Fibroblasten, oder Zellen von Fibroblastenzelllinien, die entweder auf den HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt oder die mit dem entsprechenden MHC-I-Gen transfiziert worden sind, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einem oder mehreren Peptiden beladen werden, die von Tumorantigenen abgeleitet sind, die von den Tumorzellen des Patienten exprimiert werden. Die so behandelten und bestrahlten Fibroblasten können als solche oder in Mischung mit Peptid-behandelten Tumorzellen als Tumorstoffe verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform können statt Fibroblasten dendritische Zellen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt werden. Dendritische Zellen sind APCs der Haut; sie können wahlweise *in vitro* beladen werden, d.h. aus dem Patienten isolierte Zellen werden *in vitro* mit einem oder mehreren Peptiden versetzt, wobei die Peptide von

Tumorantigenen des Patienten abgeleitet sind und an ein MHC-I- oder an ein MHC-II-Molekül des Patienten binden. In einer weiteren Ausführungsform können diese Zellen auch *in vivo* mit dem Peptid beladen werden. Dazu injiziert man die Komplexe aus Peptid, Polykation und gegebenenfalls DNA vorzugsweise intradermal, weil in der Haut dendritische Zellen besonders häufig vorzufinden sind.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde das Peptid mit TfpL oder pL für den Transfer in CT-26 Zellen und mit TfpL und einem nicht funktionellen Plasmid (Leervektor) für den Transfer in M-3 Zellen komplexiert. Im CT-26 System wurde festgestellt, daß die mit dem Peptid verfremdeten, bestrahlten Tumorstoffe eine effiziente Antitumor-Immunität generierten: 75 % der geimpften Mäuse konnten eine Tumorchallenge eliminieren, die bei allen Kontrolltieren, die entweder keine Vakzine oder eine Vakzine ohne das Xenopeptid erhielten, zu Tumorbildung führte. Im M-3 System wurde dasselbe Xenopeptid unter Bedingungen, die für den Organismus hinsichtlich Tumorbildung noch höhere Stringenz aufwiesen, in einem experimentellen Ansatz getestet, der der Situation im Menschen nachempfunden ist. Metastasen-tragende Mäuse wurde mit xenopeptisierten, bestrahlten M-3 Zellen geimpft. 87.5 % der so geimpften Mäuse konnten die Metastasen eliminieren, während alle unbehandelten und 7 von 8 Mäusen von den Mäusen an Tumoren erkrankten, die Vakzine ohne das Xenopeptid erhalten hatten.

Es wurde außerdem festgestellt, daß das Ausmaß der systemischen Immunantwort der Tumorstoffe von der Methode abhängig ist, mit der das Peptid auf die Tumorzellen aufgebracht wird. Wenn das Peptid mittels Polylysin/Transferrin den Zellen verabreicht wurde, war der Effekt deutlich ausgeprägter als wenn die Zellen 24 h mit dem Peptid inkubiert wurden ("Pulsen"). Auch das adjuvante Beimischen des Peptides zu den bestrahlten Vakzinen war wenig effizient. Durch die



Transferrinfektion dürfte entweder eine effizientere Aufnahme des Peptids in die Zellen gewährleisten sein, oder aber die Beladung mit Polylysin/Transferrin bewirkt, daß das Peptid an der Zellmembran haften bleibt, somit physikalisch in die Nähe der MHC-I-Moleküle gebracht wird und dann an diese binden kann, wobei es aufgrund seiner starken Affinität zelluläre Peptide, die schwächer gebunden sind, verdrängen kann.

### Figurenübersicht

- Fig. 1a-c: FACS-Analyse von Fremdpeptid-behandelten M-3-Zellen
- Fig. 1d: Mikrofotografien von FITC-Peptid-behandelten M-3-Zellen
- Fig. 2a,b: Heilung von M-3-Melanommetastasen tragenden DBA/2-Mäusen durch eine Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen M-3-Zellen
- Fig. 3a: Titration von Fremdpeptid für die Herstellung einer Tumorstakzine
- Fig. 3b: Vergleich einer Tumorstakzine aus Fremdpeptid-beladenen Tumorzellen mit einer IL-2 sekretierenden Tumorstakzine
- Fig. 4a: Schutz von Balb/c-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Colonkarzinomzellen
- Fig. 4b: Untersuchung der Beteiligung von T-Zellen an der systemischen Immunität
- Fig. 5: Schutz von C57BL/6J-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen

In den folgenden Beispielen wurden, wenn nicht anders angegeben, die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

Die Maus-Melanomzelllinie Cloudman S91 (Klon M-3; ATCC No. CCL 53.1) wurde von ATCC erworben.

Die Melanomzelllinie B16-F10 (Fidler et al., 1975) wurde vom NIH DCT Tumor Depository erworben.

Die Herstellung von Transferrin-Polylysin-Konjugaten, von DNA enthaltenden Transfektionskomplexen wurde vorgenommen, wie in der WO 94/21808 beschrieben.

Die Peptide LFEAIEGFI, FFIGALEEI, LPEAIEGFG, und ASNENMETM wurden auf einem Peptid-Synthesizer (Modell 433 A mit Feedbackmonitor, Applied Biosystems, Foster City, Kanada) unter Verwendung von TentaGel S PHB (Rapp, Tübingen) als Festphase nach der Fmoc-Methode (HBTU-Aktivierung, Fastmoc<sup>TM</sup>, Maßstab 0:25 mmol) synthetisiert. Die Peptide wurden in 1 M TEAA, pH 7.3 aufgelöst und mittels reverser Chromatographie auf einer Vydac C 18-Säule gereinigt. Die Sequenzen wurden mittels Flugzeitmassenspektrometrie auf einem MAT Lasermat (Finnigan, San Jose, Kanada) bestätigt.

Die Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzine auf ihre Schutzwirkung gegen Metastasenbildung ("Therapeutisches Mausmodell") sowie die Testung im prophylaktischen Mausmodell wurde nach dem in der WO 94/21808 beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei als Mausmodell das DBA/2-Modell und das Balb/c-Modell verwendet wurden.

#### Beispiel 1

Vergleichende FACS-Analyse von M-3-Zellen, die mittels verschiedenen Methoden mit Fremd-Peptid behandelt wurden

Für diese Untersuchung, die in Fig. 1 dargestellt ist, wurde das Xenopeptid LFEAIEGFI auf M-3-Zellen einmal mit TfpL/DNA-Komplexen aufgebracht ("Transloading"; Fig. 1a), einmal wurden die Zellen mit dem Peptid

inkubiert ("Pulsen"; Fig. 1b) und einmal wurde das Peptid den Zellen adjuvant beigemischt (Fig. 1c).

Für das Transloading wurden 160 µg FITC-markiertes Xenopeptid LFEAIEGFI bzw. unmarkiertes Kontrollpeptid mit 3 µg Transferrin-Polylysin (TfpL), 10 µg pL und 6 µg psp65 (Boehringer Mannheim, LPS frei) in 500 µl HBS-Puffer gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die obige Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  M-3 Zellen in 20 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS/2 mM EDTA abgelöst und für die FACS-Analyse in 1 ml PBS/5 % FCS resuspendiert.

Das Pulsen der Zellen mit dem Peptid wurde mit  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen in 20 ml DMEM mit 450 µg Peptid (FITC-markiert bzw. unmarkiert) während 3 h bei 37°C durchgeführt.

Für das adjuvante Beimischen wurden vor der FACS-Analyse  $10^6$  von der Kulturflasche abgelöste Zellen mit 100 µg FITC-markiertem Peptid in 1 ml PBS/5% FCS 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden nach Austausch von PBS/5% FCS gewaschen und noch einmal analysiert. Die FACS-Analyse wurde unter Verwendung eines FACS Vantage Geräts (Becton Dickinson), ausgerüstet mit einem 5 W Argon Laser, eingestellt auf 100 mW bei 488 nm, nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in den Fig. 1a bis 1c dargestellt. Fig. 1d zeigt Mikrofotografien von zytozentrifugierten M-3-Zellen: das obere Bild zeigt Zellen, die das Peptid mittels dem Komplex ("Transloading") erhalten hatten, das untere Bild zeigt Zellen, die mit dem Peptid inkubiert ("Pulsen") worden waren. Für die Gegenfärbung des Kerns wurde DAPI verwendet.

M-3-Zellen, die mit dem das Peptid enthaltenden Komplex beladen worden waren, zeigten eine Verschiebung der Fluoreszenz um beinahe 2 Zehnerpotenzen im Vergleich zu

unbehandelten oder mit Polylysin allein behandelten Zellen, was auf einen effizienten Transfer des Peptids auf die Zellen mittels TfpL/DNA-Komplex hinweist (Fig. 1a). Die Inkubation mit Peptid (Pulsen) war weniger wirksam, was sich in der Verschiebung der Fluoreszenz um nur eine Zehnerpotenz niederschlägt, die in der Fluoreszenzmikroskopie praktisch nicht nachweisbar war (Fig. 1d). Im Falle des adjuvanten Beimischens verschwand das Peptid nach dem Waschschrift (Fig. 1c), was daraufhindeutet, daß die Peptidbindung höchstens geringfügig war.

## Beispiel 2

Heilung von Melanommetastasen aufweisenden DBA/2-Mäusen mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen ("Therapeutisches Mausmodell")

### a) Herstellung einer Tumormvakzine aus M-3-Zellen

160 µg Xenopeptid LFEAIEGFI wurden mit 3 µg Transferrin-Polylysin (TfpL), 10 µg pL und 6 µg psp65 (LPS frei) in 500 µl HBS-Puffer gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die obige Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  M-3 Zellen in 20 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen mit 15 ml frischem Medium versetzt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 4 h vor der Applikation wurden die Zellen mit 20 Gy bestrahlt. Die Aufarbeitung der Vakzine erfolgte wie in WO 94/21808 beschrieben.

### b) Wirksamkeit der Tumormvakzine

6 - 12 Wochen alte DBA/2 Mäuse mit einer Fünftages-Metastase (erzeugt durch die subkutane Injektion von  $10^4$  lebenden M-3 Zellen) wurden zweimal im Abstand von einer Woche mittels subkutaner Injektion mit der Tumormvakzine behandelt (Dosis:  $10^5$  Zellen/Tier). Es standen 8 Mäuse im Experiment. Das Ergebnis der

Versuche ist in Fig. 2a dargestellt; es zeigte sich, daß 7 von 8 Tieren nach Verabreichung der Vakzine, die mittels TfpL/DNA-Komplexen auf die Tumorzellen geladenes Peptid enthielten, geheilt wurden. In Vergleichsversuchen wurde eine Vakzine verwendet, in der das Peptid LFEAIEGFI (400 µg oder 4 mg) mittels Inkubation (3 h bei 37°C; "Pulsen") auf die Zellen aufgebracht worden war. Von den Tieren, die eine Vakzine mit 400 µg Peptid erhalten hatten, blieben 3 von 8 tumorfrei, die Vakzine aus mit 4 mg Peptid behandelten Zellen heilte nur 1 von 8 Tieren. Kontrollen waren bestrahlte M-3-Zellen allein sowie Zellen, die ohne Peptid mit den Komplexen beladen worden waren (jeweils 1/8 Tieren blieb tumorfrei). Bei der Gruppe der Kontrolltiere, die keinerlei Behandlung unterzogen worden, entwickelten alle Tiere Tumore.

Um die Relevanz einerseits der Herstellungsmethode der Vakzine, andererseits der Peptidsequenz zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt; in diesen Experimenten wurde eine hochtumorigene Variante der M-3-Zellen verwendet. In den Versuchen, in denen die Bedeutung der Behandlungsmethode getestet wurde, wurden Vakzine hergestellt, in denen das Peptid nicht mittels Polylysin-Transferrin auf die Zellen geladen wurde, sondern den Zellen lediglich adjuvant beigemischt wurde. Für die Kontrolle bezüglich der Peptidsequenz wurden die Ankeraminosäuren des Peptids an Position 2 und 9, nämlich Phenylalanin und Isoleucin, durch Prolin bzw. Glycin ersetzt, was zum Peptid Leu Pro Glu Ala Ile Glu Gly Phe Gly (LPEAIEGFG) führte; diesem Peptid fehlt die Fähigkeit zur H2-K<sup>d</sup>-Bindung. Die Metastasenbildung wurde mindestens einmal pro Woche kontrolliert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 2b zu sehen. Die Vakzine, hergestellt durch Beladen der Zellen mit LFEAIEGFI mittels den TfpL/DNA-Komplexen, heilte 6 von 8 Tieren. Hingegen entwickelten 7 von 8 Tieren Tumore, die eine Vakzine erhalten hatten, für die das Peptid LFEAIEGFI den Zellen lediglich beigemischt wurde bzw. die aus Zellen

bestand, die mittels TfpL/DNA-Komplexen mit dem veränderten, nicht an das HLA-Motiv bindenden Peptid LPEAIEGFG beladen wurden. In der Kontrollgruppe, die mit nur bestrahlten M-3-Zellen behandelt worden war bzw. die keinerlei Behandlung erhielt, entwickelten alle Tiere Tumore.

c) Untersuchung des Einflusses der Peptidmenge in der Vakzine

Es wurden, wie in a) beschrieben, Peptid enthaltende Komplexe hergestellt, die entweder 50, 5 oder 0.5  $\mu$ g des wirksamen Peptides LFEAIEGFI enthielten, und damit M-3 Zellen beladen. Als Vergleich diente eine IL-2 Vakzine, die die optimale Dosis an IL-2 sekretierte (s. d) ). Mit dieser Vakzine wurden DBA/2 Mäuse geimpft, die eine Fünftagesmetastase trugen. Die Vakzine mit 50  $\mu$ g Peptid heilte 6 von 8 Mäusen, die mit 5  $\mu$ g 4 von 8, ebenso wie die IL-2 Vakzine, während die 0.5  $\mu$ g enthaltene Vakzine nur 2 von 8 Tieren heilte. Dieser Versuch ist in Fig. 3a dargestellt.

Beispiel 3

Vergleich der Fremdpeptid enthaltenden Vakzine mit einer Tumorstoffvakzine aus IL-2 sekretierenden Tumorzellen im prophylaktischen Mausmodell

In Vergleichsversuchen wurden zwei Gruppen von Versuchstieren (je 8) einerseits mit der in Beispiel 2a) beschriebenen Vakzine, andererseits mit einer Vakzine aus IL-2 sekretierenden M-3-Zellen (hergestellt nach dem in der WO 94/21808 beschriebenen Protokoll, IL-2-Dosis 2.000 Einheiten pro Tier) in einem Abstand von 1 Woche 2 x vorimmunisiert. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden, bei steigender Zahl von Tumorzellen, contralateral Tumore gesetzt ("Challenge"; die Dosis ist in Fig. 3b angegeben). Es zeigte sich, daß die Vorimmunisierung mit der erfindungsgemäßen Tumorstoffvakzine einer Behandlung mit der IL-2-Vakzine überlegen war: naive Mäuse, geimpft mit der IL-2-

Vakzine, waren nur gegen eine Dosis von  $10^5$  lebenden, hochtumorigenen Zellen (M-3-W) geschützt. Die Kapazität dieser Vakzine war jedoch bei einer Challenge von  $3 \times 10^5$  Zellen erschöpft, während eine Tumorbelastrung dieses Ausmaßes von Tieren, die mit der Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Tumorzellen vorimmunisiert worden waren, erfolgreich bekämpft wurde.

#### Beispiel 4

Schutz von Balb/c-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Colonkarzinomzellen ("Prophylaktisches Mausmodell")

##### a) Herstellung der CT-26 Vakzine

160  $\mu\text{g}$  Xenopeptid LFEAIEGFI bzw. FFIGALEEI wurden mit 12  $\mu\text{g}$  pL bzw. mit 3  $\mu\text{g}$  Transferrin-Polylysin plus 10  $\mu\text{g}$  Polylysin, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur in 500  $\mu\text{l}$  HBS-Puffer komplexiert und anschließend in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  CT-26 Zellen in 4 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) transferiert, anschließend wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 4 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 15 ml frischem Medium versetzt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. 4 h vor der Applikation wurden die Zellen mit 100 Gy bestrahlt. Die Aufarbeitung der Vakzine erfolgte wie in der WO 94/21808 beschrieben.

##### b) Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzine auf ihre Schutzwirkung gegen CT-26 Challenge

6 - 12 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden zweimal in einwöchigem Abstand durch subkutane Injektion vakziniert (Zelldosis:  $10^5$ /Maus). Pro Gruppe standen 8 Mäuse (bzw. 7 Mäuse bei dem Versuch, bei dem pL für das Beladen der Zellen verwendet wurde) im Experiment. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden contralateral Tumore mit  $5 \times 10^4$  parentalen CT-26-

Zellen gesetzt. Vergleichsversuche, in denen die Vakzine auf andere Weise als mittels den Komplexen aus TfpL/DNA hergestellt wurde sowie die Kontrollen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 2 beschrieben. Das Auswachsen der Tumorchallenge wurde mindestens einmal pro Woche kontrolliert. Das Ergebnis für Peptid LFEAIEGFI ist in Fig. 4a zu sehen; es wurden 6 von 8 Tieren geschützt. Im Fall von Peptid FFIGALEEI (nicht in Fig. 4a gezeigt, wurden 4 von 8 Tieren geschützt).

c) Beteiligung von T-Zellen an der Wirkung der Tumorvakzine

Um die Beteiligung von T-Zellen an der durch die CT-26-Vakzine bewirkten systemischen Immunität nachzuweisen, wurden in einem weiteren Versuch 24 h vor der Vakzinierung CD4<sup>+</sup>-Zellen durch intravenöse Injektion von 500 µg monoklonalen Antikörper GK1.5 (ATCC TIB 207), CD8<sup>+</sup>-Zellen durch intravenöse Injektion von 500 µg monoklonalen Antikörper 2.43 (ATCC TIB 210) entfernt. Eine positive Kontrollgruppe erhielt die Vakzine, ohne daß CD4<sup>+</sup>-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen entfernt worden waren. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 4b dargestellt: Die Beteiligung der T-Zellen zeigt sich daran, daß alle Tiere, denen T-Zellen entfernt worden waren, Tumore entwickelten.

Beispiel 5

Schutz von C57BL/6J-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen ("Prophylaktisches Mausmodell")

In diesem Beispiel wurden als Versuchstiere Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet (jeweils 8 Tiere pro Gruppe). Als Melanomzellen wurden die für den verwendeten Mausstamm syngenen Zellen B16-F10 (NIH DCT Tumor Depository; Fidler et al., 1975) verwendet.



Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden zweimal in einwöchigem Abstand durch subkutane Injektion von  $10^5$  B16-F10-Zellen pro Maus vakziniert:

In einer Versuchsserie wurde die Vakzine hergestellt, indem bestrahlte B16-F10-Zellen mit dem Peptid der Sequenz ASNENMETM beladen wurden, wie in Beispiel 2 für die Vakzine aus M-3-Zellen beschrieben.

In Parallelversuchen wurden IL-2 bzw. GM-CSF sekretierende B16-F10-Zellen (hergestellt nach dem in der WO 94/21808 beschriebenen Protokoll) als Vakzine für die Vorimmunisierung verwendet; die Vakzine produzierte 1.000 Einheiten IL-2 bzw. 200ng GM-CSF pro Tier.

Eine Kontrollgruppe erhielt für die Vorimmunisierung bestrahlte und ansonsten unbehandelte B16-F10-Zellen.

Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden den Versuchstieren mit  $1 \times 10^4$  lebenden, bestrahlten B16-F10-Zellen Tumore gesetzt und anschließend das Tumorstadium verfolgt.

Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 5 dargestellt; die mit dem Fremdpeptid beladenen Tumorzellen zeigten die beste Schutzwirkung vor Tumorbildung.

## Tabelle

<u>Peptidsequenz</u>	<u>MHC-Haplotyp</u>	<u>Antigen</u>	<u>Referenz</u>
SPSYVYHQF	Ld	gp70, endogenes MuLV	Huang und Pardoll, 1996
FEQNTAQA	Kb	Connexin37	Mandelboim, et al., 1994
FEQNTAQP	Kb	Connexin37	Mandelboim, et al., 1994
SYFPEITHI	Kd	JAK1	Rammensee, et al., 1995
EADPTGHSY	HLA-A1	MAGE-1	Rammensee, et al., 1995
EVDPIGHLV	HLA-A1	MAGE-3	Rammensee, et al., 1995
YMNGTMSQV	HLA-A2+ HLA-A0201	Tyrosinase	Rammensee, et al., 1995
MLLALLYCL	HLA-A0201	Tyrosinase	Rammensee, et al., 1995
AAGIGILTV	HLA-A0201	Melan A/Mart1	Rammensee, et al., 1995
YLEPGPVTA	HLA-A0201	pmel17/gp100	Rammensee, et al., 1995
ILDGTATLRL	HLA-A0201	pmel17/gp100	Rammensee, et al., 1995
SYLDSGIHF	HLA-A24	$\beta$ -Catenin	Robbins, et al., 1996
AINNYAQKL CKGVNKEYL QGINNLDNL NLDNLRDYL	Db	SV-40 großes T-Antigen	Lill, et al., 1992

Tabelle (Fortsetzung)

<u>Peptidsequenz</u>	<u>MHC-Haplotyp</u>	<u>Antigen</u>	<u>Referenz</u>
EEKLIVVLF	HLA-B44	MUM-1	Coulie, et al., 1995
AQDPHSGHFV	HLA-A2	mutiertes CDK4	Wolfel, et al., 1995
AYGLDFYIL	HLA-A24	p15, unbekannte Funktion	Robbins, et al., 1995
KTWGQYWQV YLEPGPVTA	HLA-A2	gp100	Kawakami und Rosenberg, 1995
HMTEVVRHC	HLA-A2	mutiertes p53	Houbiers, et al., 1993
KYICNSSCM	Kd	mutiertes p53	Noguchi, et al., 1994
GLAPPQHEI LLGRNSEEM	HLA-A2	mutiertes p53	Stuber, et al., 1994
LLPENNVLSPL RMPEAAPPV LLGRNSFEV	HLA-A2	Wildtyp p53	Theobald, et al., 1995
LLGRDSFEV	HLA-A2	mutiertes p53	Theobald, et al., 1995

## LITERATUR

- Alexander, J. et al., 1989, Immunogenetics 29, 380
- Allred, D.C. et al., 1992, J. Clin. Oncol. 10 (4),  
599-605
- Behr, J.P., 1994, Bioconjug-Chem., Sept-Oct, 5(5),  
382-9
- Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr.,  
Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B.  
Lippincott Company, Philadelphia, New York,  
London, Hagerstown
- Boon, T., 1993, Spektrum der Wissenschaft (Mai), 58-66
- Boon, T. et al., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, 337-65
- Braciale, T.J. und Braciale, V.L., 1991, Immunol.  
Today 12, 124-129
- Carrel, S. and Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in  
Oncology 5, 383-389
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H.,  
Shevach, Falk, K. et al., 1991, Nature 351,  
290-296
- Coulie, P.G. et al., 1992, Int. J. Cancer, 50, 289-297
- Coulie, P. G., Lehmann, F., Lethe, B., Herman, J.,  
Lurquin, C., Andrawiss, M., und Boon, T. (1995).  
Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7976-80
- Cox, A.L. et al., 1994, Science 264, 5159, 716-9
- Current Protocols im Molecular Biology, 1995,  
Herausgeber: Ausubel F.M., et al., John Wiley &  
Sons, Inc.
- Dranoff, G. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
90, 3539-3543
- Dranoff, G. und Mulligan, R.C., 1995, Advances in  
Immunology 58, 417
- Falk, K. et al., 1991, Nature 351, 290-296
- Felgner, J.H. et al., 1994, J. Biol. Chem. 269,  
2550-2561
- Fenton, R.G. et al., 1993, J. Natl. Cancer Inst. 85,  
16, 1294-302
- Fisk, B. et al., 1995, J. Exp. Med. 1881, 2109-2117

- Flow Cytometry, Acad. Press, Methods in Cell Biology, 1989, Vol. 33, Herausgeber: Darzynkiewicz, Z. und Crissman, H.A.
- Gedde Dahl, T. et al., 1992, Hum Immunol. 33, 4, 266-74
- Guarini, A. et al., 1995, Cytokines and Molecular Therapy 1, 57-64
- Han, X.K. et al., 1995, PNAS 92, 9747-9751
- Handbuch: FACS Vantage <sup>TM</sup> User's Guide, April 1994, Becton Dickinson
- Handbuch: CELL Quest <sup>TM</sup> Software User's Guide, June 1994, Becton Dickinson
- Hérin M. et al., 1987, Int. J. Cancer, 39, 390
- Hock, H. et al., 1993, Cancer Research 53, 714-716
- Houbiers, J. G., Nijman, H. W., van der Burg, S. H., Drijfhout, J. W., Kenemans, P., van de Velde, C. J., Brand, A., Momburg, F., Kast, W. M., und Melief, C. J. (1993). Eur J Immunol 23, 2072-7.
- Huang, A. Y. C., und Pardoll, D. M. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9730-5
- Jung, S. et al., 1991, J. Exp. Med. 173, 1, 273-6
- Kawakami, Y. et al., 1995, The Journal of Immunol. 154, 3961-3968
- Kärre, K. et al., 1986, Nature 319, 20. Feb., 675
- Kovacsovics Bankowski, M. und Rock, K.L., 1995, Science 267, 243-246
- Lehmann, J.M. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9891-9895
- Lethe, B. et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22, 2283-2288
- Lill, N. L., Tevethia, M. J., Hendrickson, W. G., und Tevethia, S. S. (1992). J Exp Med 176, 449-57
- Loeffler, J.-P. et al., 1993, Methods Enzymol. 217, 599-618
- Mackiewicz, A. et al., 1995, Human Gene Therapy 6, 805-811
- Malnati, M.S. et al., 1995, Science 267, 1016-1018
- Mandelboim, O. et al., 1994, Nature 369, 5.May, 67-71
- Mandelboim, O. et al., 1995, Nature Medicine 1, 11, 1179-1183

- Morishita, R. et al., 1993, J. Clin. Invest. 91, 6, 2580-5
- Nabel, G.J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11307-11311
- Noguchi, Y., Chen, Y. T., und Old, L. J. (1994). Proc Natl Acad Sci U S A 91, 3171-3175
- Oettgen, H.F. und Old, L.J., 1991, Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown, 87-119
- Ostrand-Rosenberg, S., 1994, Current Opinion in Immunology 6, 722-727
- Pardoll, D.M., 1993, Immunology Today 14, 6, 310
- Practical Immunology, Editors: Leslie Hudson and Frank C. Hay, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne
- Peace, D.J. et al., 1991, J. Immunol. 146, 6, 2059-65
- Peoples, G.E. et al., 1994, J. Immunol. 152, 10, 4993-9
- Plautz, G.E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4645-4649
- Rammensee, H.G. et al., 1993, Current Opinion in Immunology 5, 35-44
- Rammensee, H.G., 1995, Current Opinion in Immunology 7, 85-96
- Rammensee, H. G., Friede, T., und Stepvanovic, S. (1995). Immunogenetics 41, 178-228
- Remy, J.S. et al., 1994, Bioconj-chem., Nov-Dec, 5(6), 647-54
- Rivoltini, L. et al., 1995, The Journal of Immunology 154, 2257-2265
- Robbins, P. F., el Gamil, M., Li, Y. F., Topalian, S.L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y., und Rosenberg, S. A. (1995). J Immunol 154, 5944-50
- Robbins, und Rosenberg. (1996). J EXP MED 183, 1185-92.
- Schmidt, W. et al., May 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4711-4714
- Skipper, J., and Stauss, H.J., 1993, J. Exp. Med. 177, 5, 1493-8

- Slingluff, C.L. et al., 1994, Current Opinion in Immunology 6, 733-740
- Stein, D. et al., 1994, EMBO-Journal, 13, 6, 1331-40
- Stuber, G., Leder, G. H., Storkus, W. T., Lotze, M. T., Modrow, S., Szekely, L., Wolf, H., Klein, E., Karre, K., und Klein, G. (1994). Eur J Immunol 24, 765-768
- Sykulev, Y. et al., 1994, Immunity 1, 15-22
- Theobald, M., Levine, A. J., und Sherman, L. A. (1995) PNAS 92, 11993-7
- Tibbets, L.M. et al., 1993, Cancer, Jan. 15., Vol.71, 2, 315-321
- van der Bruggen, P. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24, 9, 2134-40 Issn: 0014-2980
- Van Pel, A. and Boon, T., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4718-4722
- Wölfel, T. et al., 1994 a), Int. J. Cancer 57, 413-418
- Wölfel, T. et al., 1994 b), Eur. J. Immunol. 24, 759-764
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., und Beach, D. (1995). Science 269, 1281-4
- York, I.A. und Rock, K.L., 1996, Ann. Rev. Immunol. 14, 369-396
- Yoshino, I. et al., 1994 a), J. Immunol. 152, 5, 2393-400
- Yoshino, I. et al., 1994 b), Cancer Res., 54, 13, 3387-90
- Zatloukal, K. et al., 1993, Gene 135, 199-20
- Zatloukal, K. et al., 1995, J. Immun. 154, 3406-3419

## Patentansprüche

1. Tumorstovakzine für die Verabreichung an einem Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß sie Tumorzellen enthält, die von sich aus von Tumorstantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist, und die mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen, wobei die Peptide
  - a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam ist, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder
  - b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von Tumorstantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden und in einer Konzentration auf den Tumorzellen der Vakzine vorliegen, die höher ist als die Konzentration eines Peptids, das von demselben Tumorstantigen abgeleitet ist wie das auf den Tumorzellen des Patienten exprimierte.
2. Tumorstovakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie autologe Tumorzellen enthält.



3. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie allogene Tumorzellen enthält.
4. Tumorstakzine nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die allogenen Tumorzellen Zellen einer oder mehrerer Zelllinien sind, von denen zumindest eine Zelllinie mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorstantigene exprimiert, die identisch sind mit den Tumorstantigenen des zu behandelnden Patienten.
5. Tumorstakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von autologen und allogenen Zellen besteht.
6. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) oder b) ein H2-K<sup>d</sup>-Ligand ist.
7. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) oder b) ein H2-K<sup>b</sup>-Ligand ist.
8. Tumorstakzine nach Anspruch 1, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem natürlich vorkommenden immunogenen Protein bzw. einem zellulären Abbauprodukt davon abgeleitet ist.
9. Tumorstakzine nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem viralen Protein abgeleitet ist.
10. Tumorstakzine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid von einem Influenzavirus-Protein abgeleitet ist.

11. Tumorstoffe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile aufweist.
12. Tumorstoffe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met aufweist.
13. Tumorstoffe nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem bakteriellen Protein abgeleitet ist.
14. Tumorstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem patientenfremden Tumorstoffen abgeleitet ist.
15. Tumorstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) ein synthetisches Peptid ist.
16. Tumorstoffe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile aufweist.
17. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen mit mehreren Peptiden unterschiedlicher Sequenz behandelt wurden.
18. Tumorstoffe nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Peptide dadurch unterscheiden, daß sie an unterschiedliche HLA-Subtypen binden.
19. Tumorstoffe nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Peptide hinsichtlich ihrer nicht für die HLA-Bindung maßgeblichen Sequenz unterscheiden.

20. Tumorstovakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem Tumorzellen enthält, die mit einem Zytokinen transfiziert sind.
21. Tumorstovakzine nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytokin IL-2 und/oder IFN- $\gamma$  ist.
22. Tumorstovakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem Fibroblasten enthält, die mit einem Peptid b) behandelt wurden.
23. Tumorstovakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem dendritische Zellen enthält, die mit einem Peptid b) und/oder mit einem an ein MHC-II-Molekül bindenden Peptid behandelt wurden.
24. Verfahren zur Herstellung einer Tumorstovakzine, enthaltend Tumorzellen, zur Verabreichung an einen Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorzellen, die von sich aus von Tumorantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten exprimiert, mit einem oder mehreren Peptiden behandelt, die
  - a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder die
  - b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von

Tumorantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden,

wobei man die Tumorzellen mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) so lange und in einer solchen Menge in Gegenwart eines organischen Polykations inkubiert, bis die Peptide an die Tumorzellen derart gebunden sind, daß sie im Kontext mit den Tumorzellen vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man als Polykation Polylysin einsetzt.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß man Polylysin einer Kettenlänge von ca. 30 bis ca. 300 Lysinresten einsetzt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polykation in zumindest teilweise konjugierter Form einsetzt.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation mit Transferrin konjugiert ist.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen außerdem in Gegenwart von DNA behandelt.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA ein Plasmid ist.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis DNA zu, gegebenenfalls teilweise mit einem Protein konjugiertem, Polykation ca. 1:2 bis ca. 1:5 beträgt.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Melanomzellen sind.
33. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man Peptid a) und/oder b) in einer Menge von ca. 50  $\mu\text{g}$  bis ca. 160  $\mu\text{g}$  pro  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen einsetzt.
34. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 24 bis 32 auf Fibroblasten, wobei man als Peptid ein von einem Tumorantigen des Patienten abgeleitetes Peptid b) einsetzt.
35. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 24 bis 33 auf dendritische Zellen, wobei man als Peptid ein von einem Tumorantigen des Patienten abgeleitetes Peptid b) und/oder ein Peptid einsetzt, das an ein MHC-II-Molekül des Patienten bindet.



Fig. 1

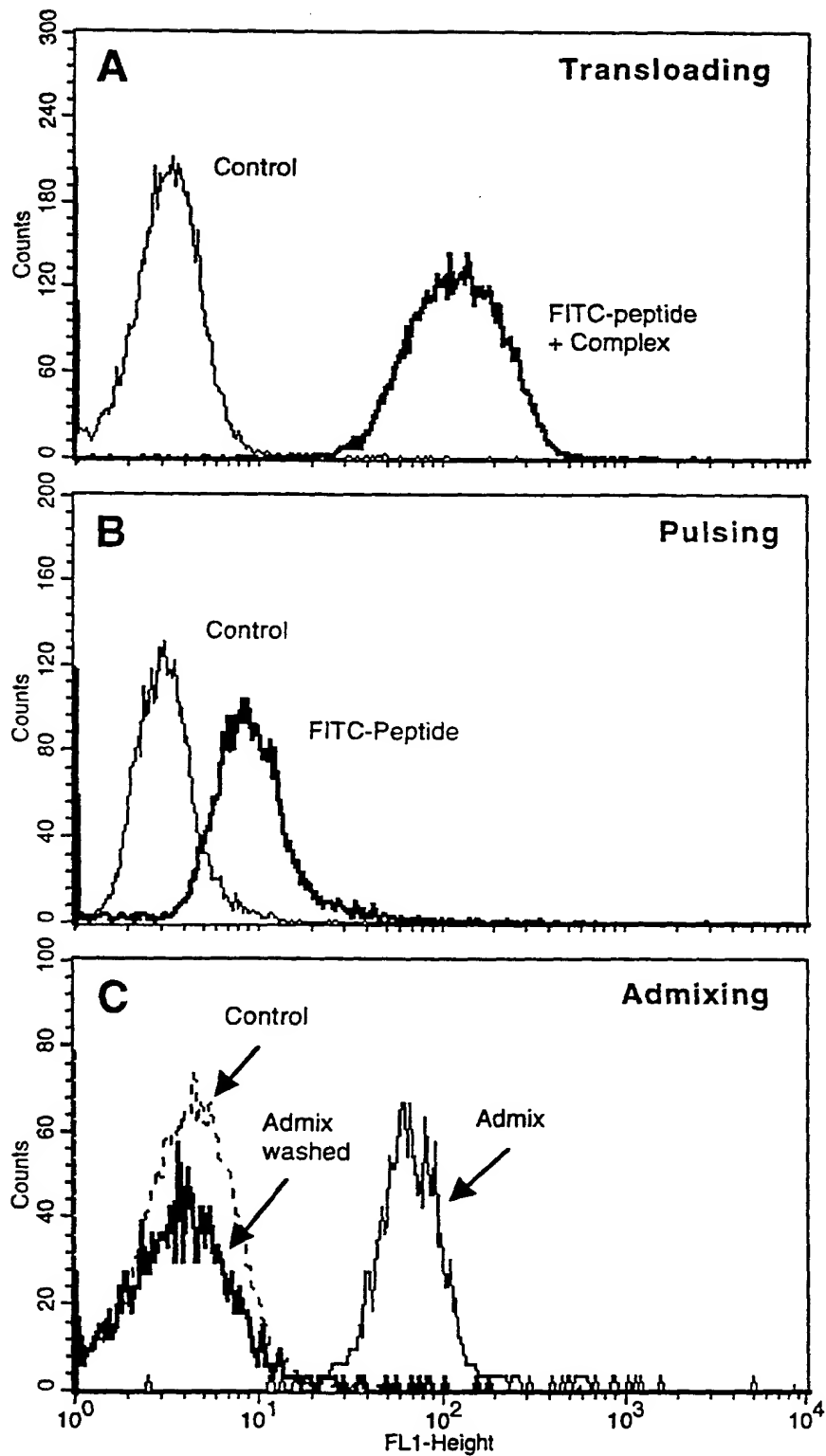
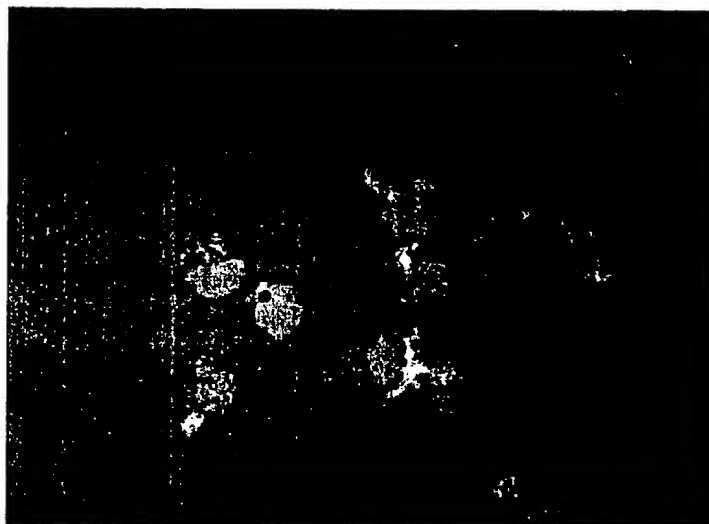






Fig. 1D



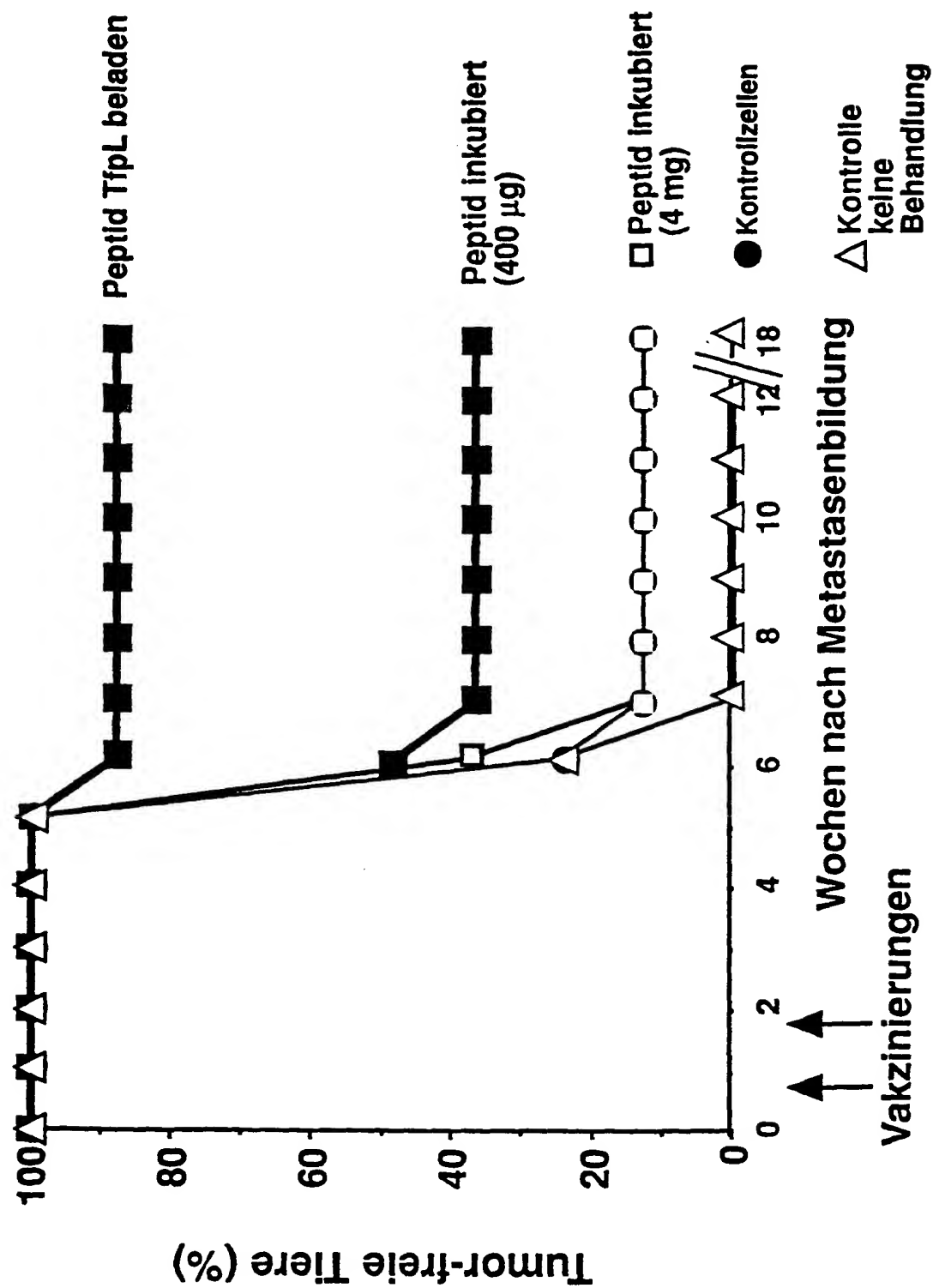
**Peptide 101 FITC pLys**



**Control**



Fig. 2A





4/9

Fig. 2B

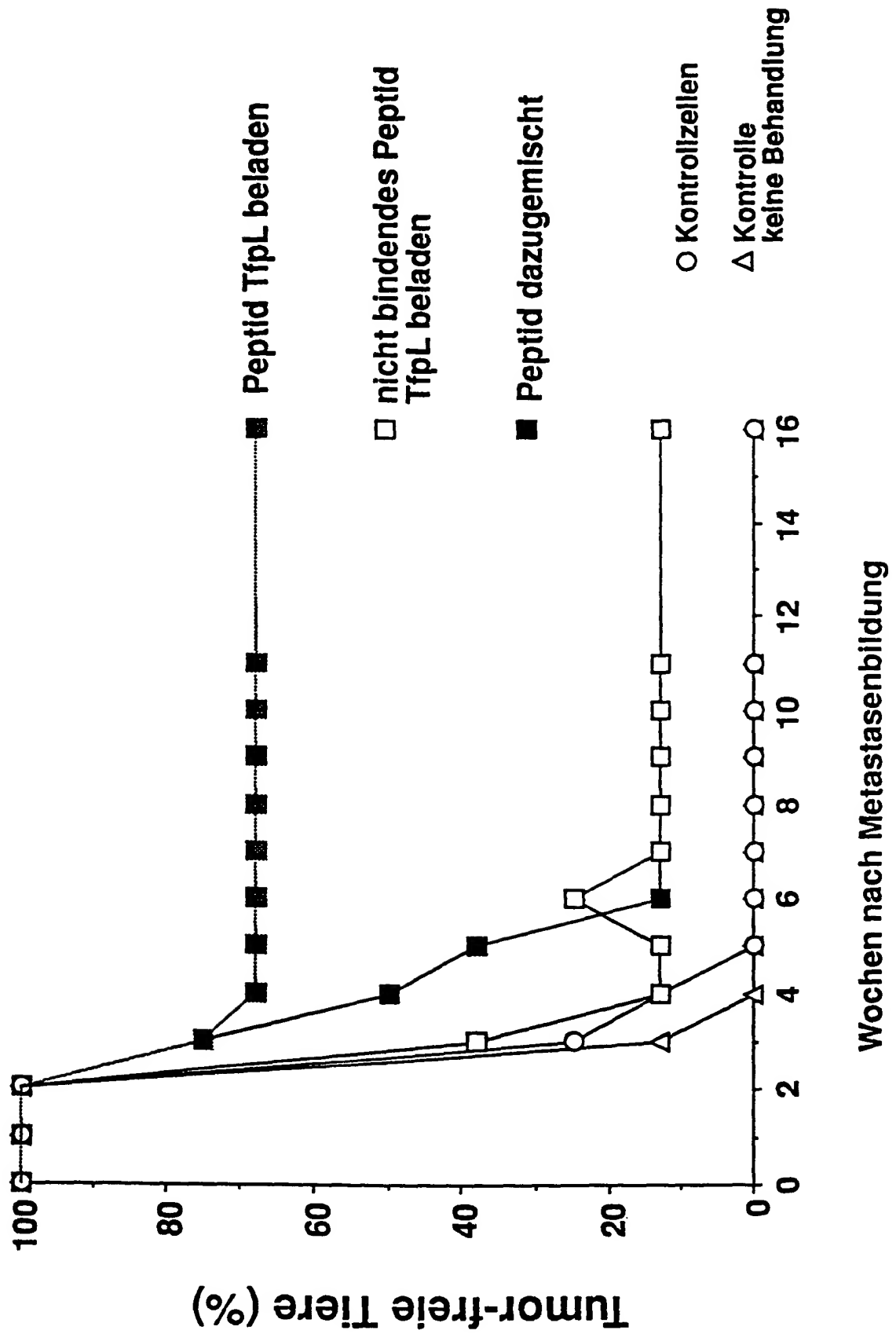




Fig. 3A

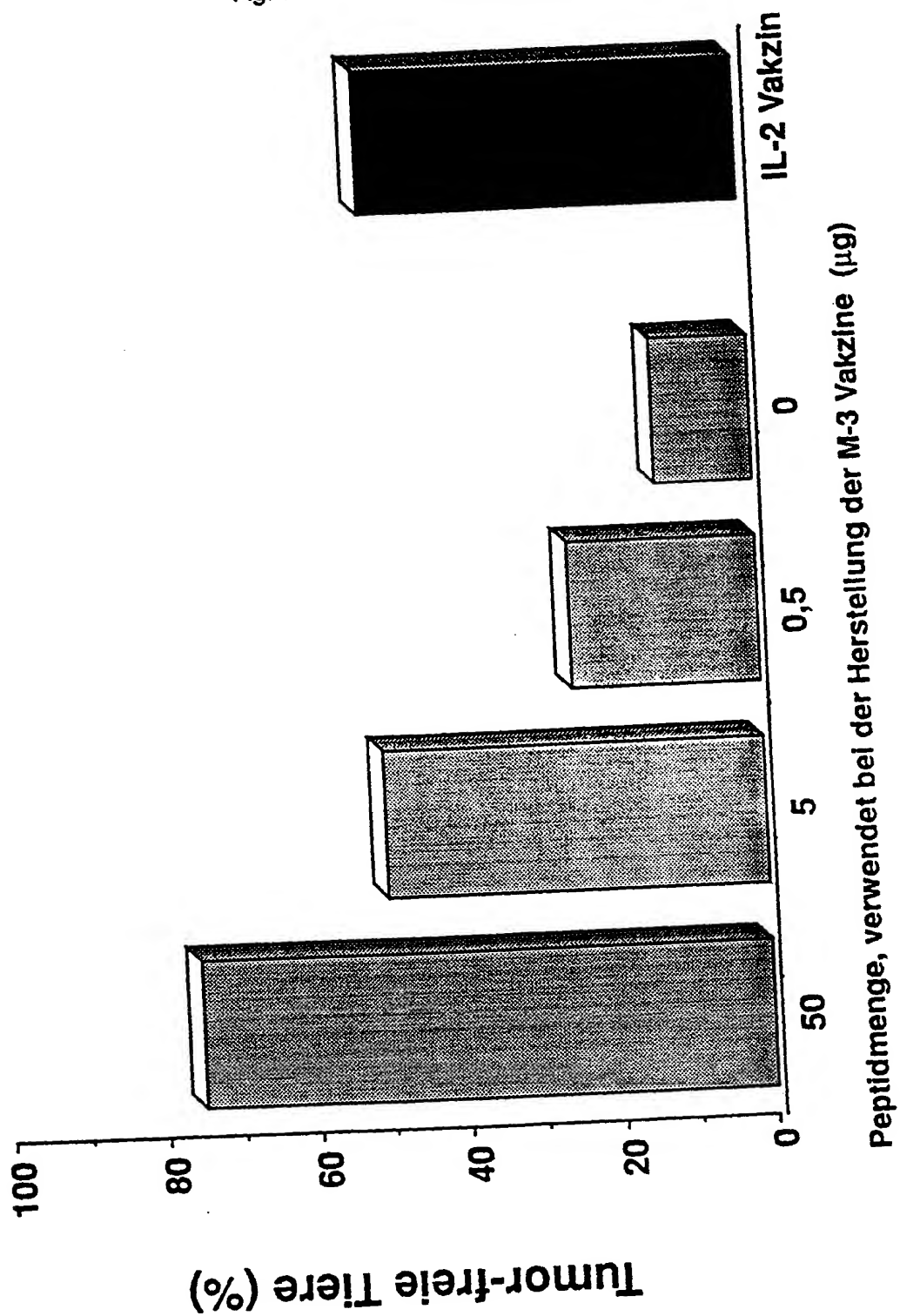
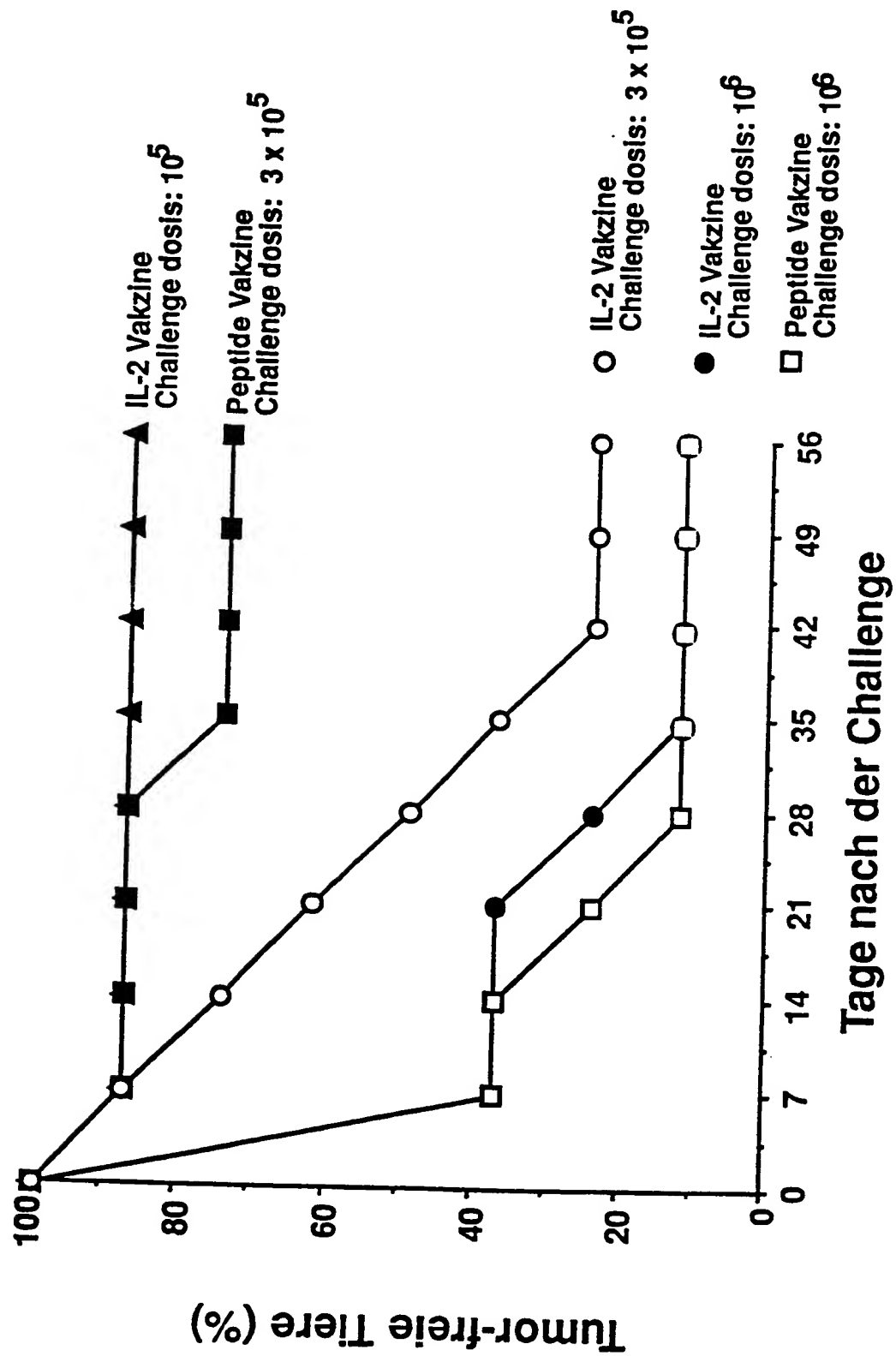






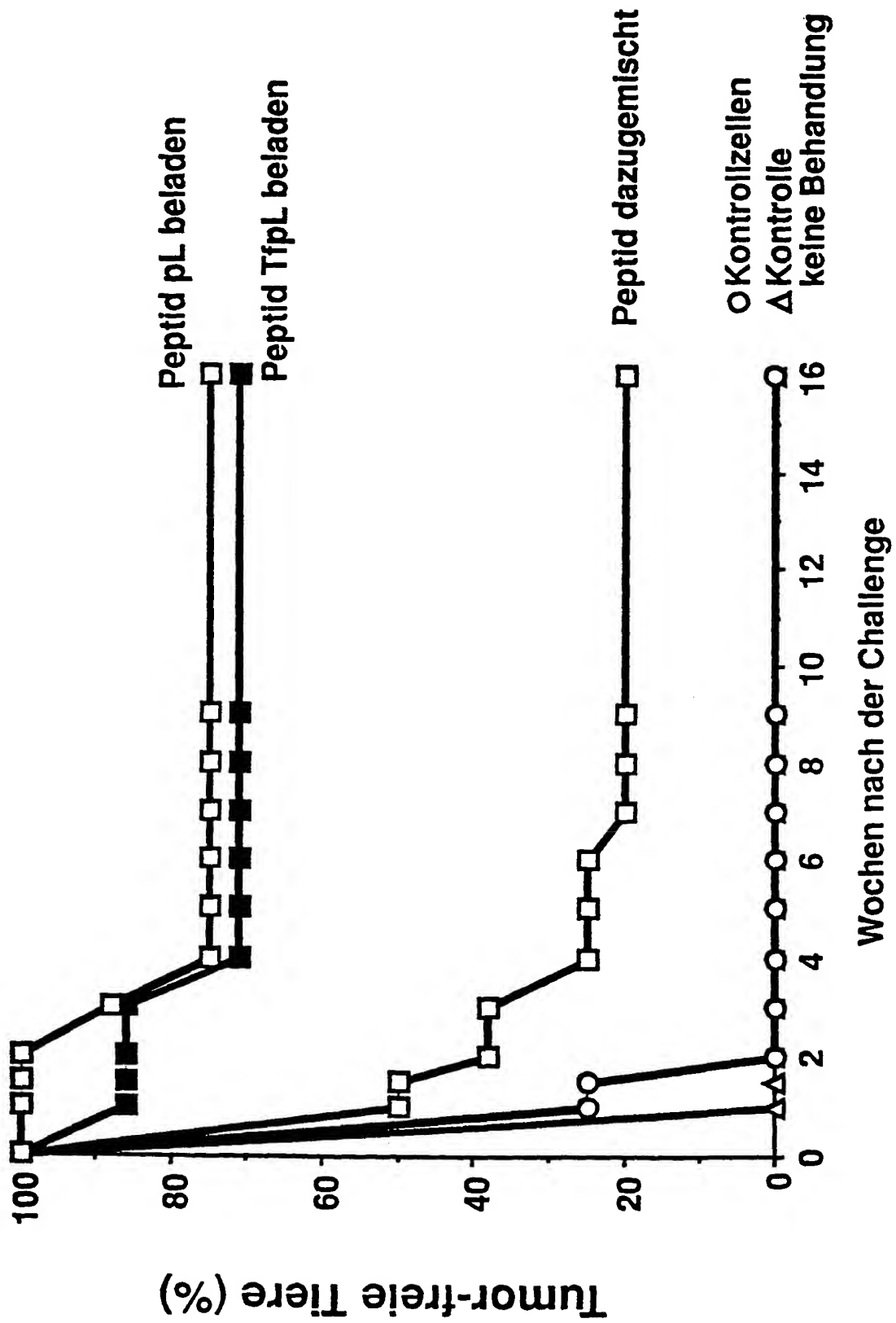
Fig. 3B





7/9

Fig. 4A





8/9

Fig. 4B

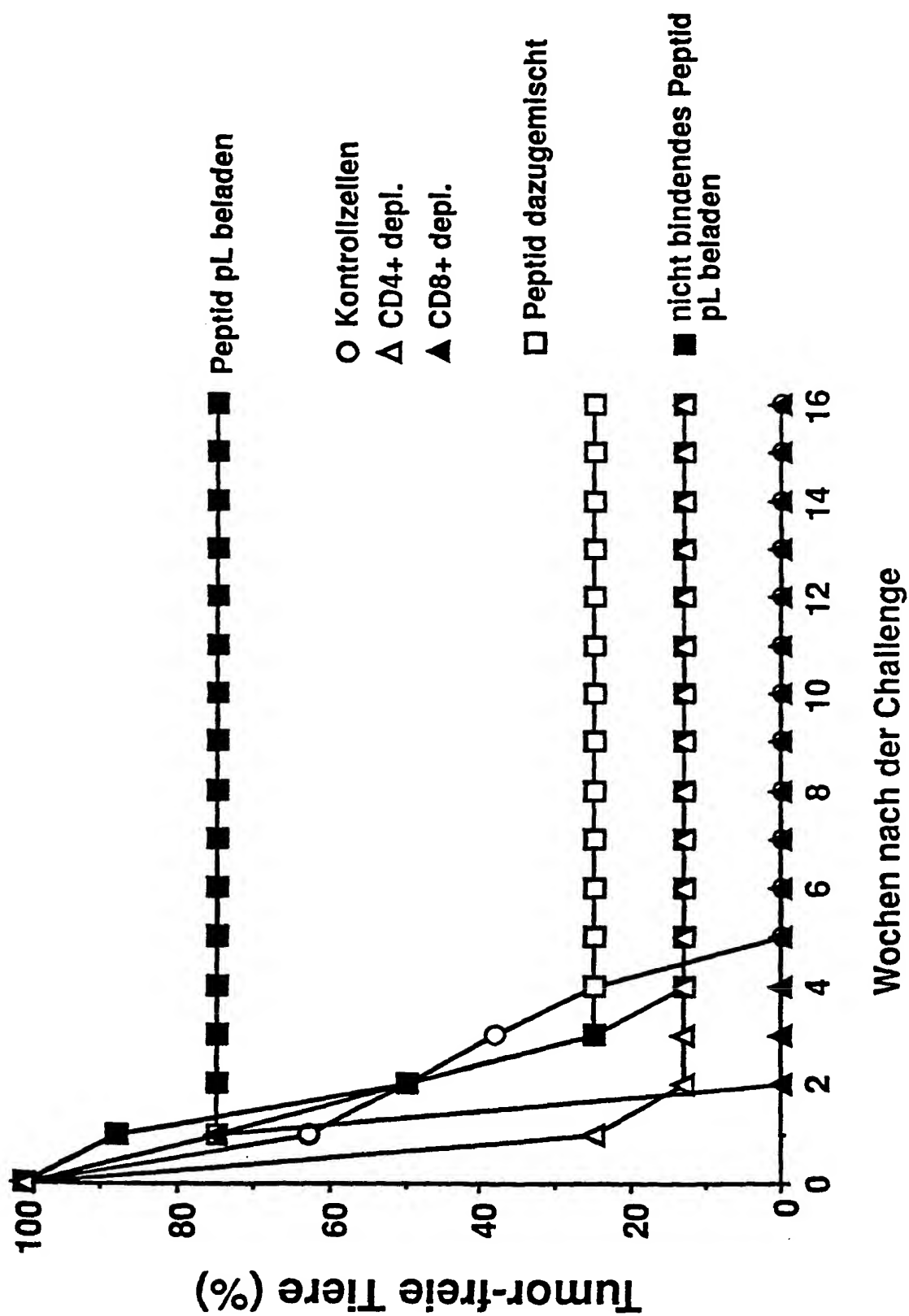
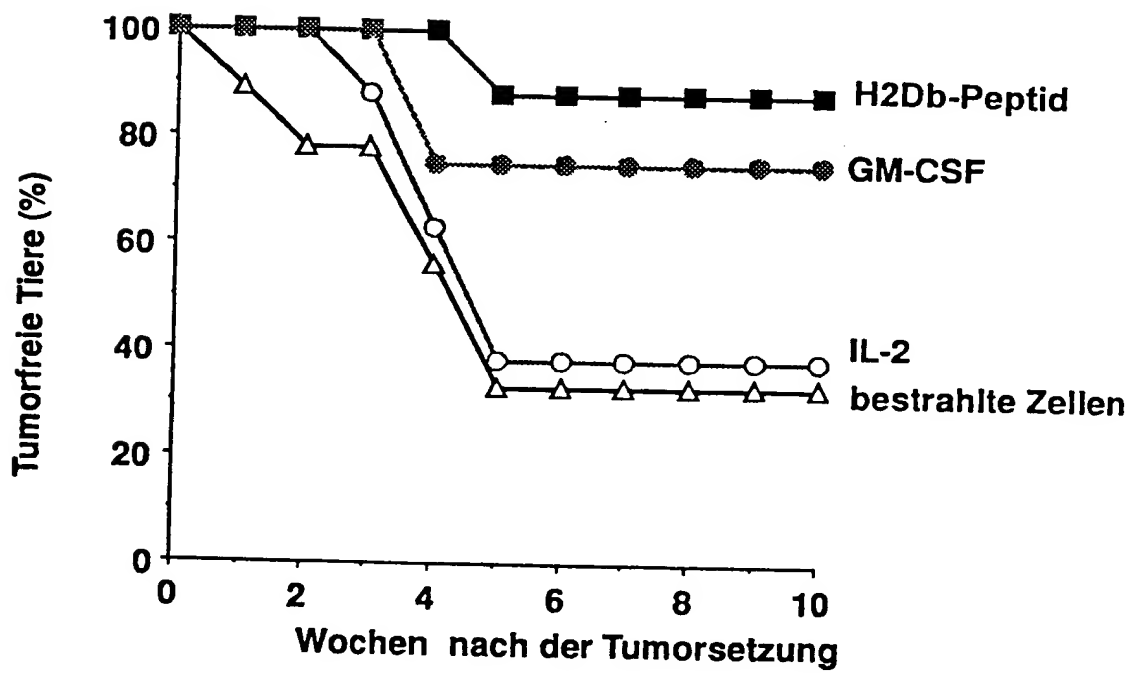




Fig.5







# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern    nal Application No  
PCT/EP 96/05126

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6    C12N5/08    A61K35/14    A61K35/26    A61K39/12    A61K38/19  
C07K14/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6    C12N    A61K    C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

P,Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 93 (18). 1996. 9759-9763. ISSN: 0027-8424, XP002025886</p> <p>SCHMIDT W ET AL: "Transloading of tumor cells with foreign major histocompatibility complex class I peptide ligand: A novel general strategy for the generation of potent cancer vaccines." see page 9761, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last paragraph</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23
-----	---	------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 1997

Date of mailing of the international search report

19. 03. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. ( + 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax ( + 31-70) 340-3016

Authorized officer

Halle, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/EP 96/05126

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	EUR. J. CANCER, PART A (1996), 32A(8), 1408-1412 CODEN: EJCTEA, 1996, XP002025887 ZIER, K. S. ET AL: "Tumor cell vaccines that secrete interleukin-2 (IL-2) and interferon.gamma. (IFN.gamma.) are recognized by T cells while resisting destruction by natural killer (NK) cells" see page 1409, left-hand column, paragraph 3 ---	1-23
Y	CELLULAR IMMUNOLOGY 155 (1). 1994. 123-133. ISSN: 0008-8749, XP000650528 BASKAR S ET AL: "MHC class II-transfected tumor cells induce long-term tumor -specific immunity in autologous mice." see page 129, paragraph 2 see page 130, paragraph 2 ---	1-23
Y	EP 0 569 678 A (YEDA RES & DEV) 18 November 1993 see claims 1-18 ---	1-23
A	WO 94 23031 A (LUDWIG INST CANCER RES) 13 October 1994 cited in the application -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. nal Application No

PCT/EP 96/05126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0569678	18-11-93	CA-A- 2092674	14-09-93
WO-A-9423031	13-10-94	AU-B- 668772	16-05-96
		AU-A- 5096993	29-03-94
		AU-A- 6447594	24-10-94
		CA-A- 2143335	17-03-94
		CA-A- 2159098	13-10-94
		CN-A- 1093751	19-10-94
		EP-A- 0658113	21-06-95
		EP-A- 0690915	10-01-96
		FI-A- 950887	27-02-95
		FI-A- 954536	25-09-95
		JP-T- 8500837	30-01-96
		JP-T- 8508402	10-09-96
		NO-A- 950660	24-02-95
		NO-A- 953699	20-11-95
		NZ-A- 263693	26-07-96
		US-A- 5462871	31-10-95
		WO-A- 9405304	17-03-94
		US-A- 5541104	30-07-96
		ZA-A- 9401644	12-10-94



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05126

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N5/08 A61K35/14 A61K35/26 A61K39/12 A61K38/19  
C07K14/725

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 93 (18). 1996. 9759-9763. ISSN: 0027-8424, XP002025886</p> <p>SCHMIDT W ET AL: "Transloading of tumor cells with foreign major histocompatibility complex class I peptide ligand: A novel general strategy for the generation of potent cancer vaccines." siehe Seite 9761, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, letzter Absatz</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19. 03. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Halle, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	EUR. J. CANCER, PART A (1996), 32A(8), 1408-1412 CODEN: EJCTEA, 1996, XP002025887 ZIER, K. S. ET AL: "Tumor cell vaccines that secrete interleukin-2 (IL-2) and interferon.gamma. (IFN.gamma.) are recognized by T cells while resisting destruction by natural killer (NK) cells" siehe Seite 1409, linke Spalte, Absatz 3 ---	1-23
Y	CELLULAR IMMUNOLOGY 155 (1). 1994. 123-133. ISSN: 0008-8749, XP000650528 BASKAR S ET AL: "MHC class II-transfected tumor cells induce long-term tumor -specific immunity in autologous mice." siehe Seite 129, Absatz 2 siehe Seite 130, Absatz 2 ---	1-23
Y	EP 0 569 678 A (YEDA RES & DEV) 18.November 1993 siehe Ansprüche 1-18 ---	1-23
A	WO 94 23031 A (LUDWIG INST CANCER RES) 13.Oktober 1994 cited in the application -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05126

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0569678	18-11-93	CA-A- 2092674	14-09-93
WO-A-9423031	13-10-94	AU-B- 668772	16-05-96
		AU-A- 5096993	29-03-94
		AU-A- 6447594	24-10-94
		CA-A- 2143335	17-03-94
		CA-A- 2159098	13-10-94
		CN-A- 1093751	19-10-94
		EP-A- 0658113	21-06-95
		EP-A- 0690915	10-01-96
		FI-A- 950887	27-02-95
		FI-A- 954536	25-09-95
		JP-T- 8500837	30-01-96
		JP-T- 8508402	10-09-96
		NO-A- 950660	24-02-95
		NO-A- 953699	20-11-95
		NZ-A- 263693	26-07-96
		US-A- 5462871	31-10-95
		WO-A- 9405304	17-03-94
		US-A- 5541104	30-07-96
		ZA-A- 9401644	12-10-94

